

AL
091530061
50C0

PCT/JP99/06213

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

ETU

08.11.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

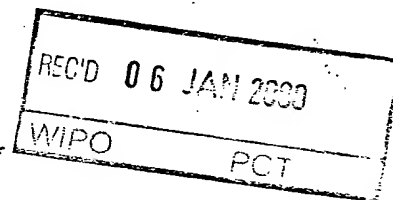
1998年11月 9日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第317476号

出 願 人
Applicant(s):

栄研化学株式会社

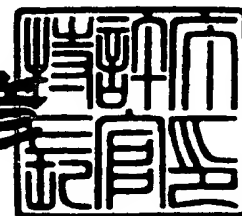


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月10日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3085326

【書類名】 特許願

【整理番号】 E2-001

【提出日】 平成10年11月 9日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68
C12N 15/09

【発明の名称】 核酸の合成方法

【請求項の数】 20

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県大田原市下石上 1 3 8 1 - 3 栄研化学株式会社
・ 那須事業所内

【氏名】 納富 継宣

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県大田原市下石上 1 3 8 1 - 3 栄研化学株式会社
・ 那須事業所内

【氏名】 長谷 哲

【特許出願人】

【識別番号】 000120456

【氏名又は名称】 栄研化学株式会社

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】 核酸の合成方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】以下の工程を含む 1 本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸の合成方法。

- a) 同一鎖上の一部 F 1 c にアニールすることができる領域 F 1 を 3' 末端に備え、この領域 F 1 が F 1 c にアニールすることによって、塩基対結合が可能な領域 F 2 c を含むループを形成することができる核酸を与える工程
- b) F 1 c にアニールした F 1 の 3' 末端を合成起点として相補鎖合成を行う工程
- c) 領域 F 2 c に相補的な配列からなる F 2 を 3' 末端に含むオリゴヌクレオチドをアニールさせ、これを合成起点として鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる相補鎖合成を行って、工程 b) で合成された相補鎖を置換する工程
- d) 工程 c) で置換され塩基対結合が可能となった相補鎖における任意の領域 R 1 c に相補的な配列からなる R 1 をアニールさせ、その 3' 末端を合成起点として鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる相補鎖合成を行って、工程 c) で合成された相補鎖を置換する工程

【請求項 2】工程 d) において、合成起点が領域 R 1 c にアニールすることができる同一鎖上の 3' 末端に存在する領域 R 1 であり、R 1 が R 1 c にアニールすることによって塩基対結合が可能な領域 R 2 c を含むループが形成される請求項 1 の方法。

【請求項 3】少なくとも以下の 2 つの領域 X 2 および X 1 c とで構成され、X 2 の 5' 側に X 1 c が連結されたオリゴヌクレオチド。

X 2 : 特定の塩基配列を持つ核酸の任意の領域 X 2 c に相補的な塩基配列を持つ領域

X 1 c : 特定の塩基配列を持つ核酸における領域 X 2 c の 5' 側に位置する領域 X 1 c と実質的に同じ塩基配列を持つ領域

【請求項 4】工程 a) における核酸が、以下の工程によって提供される第 2 の核酸である請求項 1 の方法。

- i) 鋳型となる核酸の領域 F 2 c を X 2 c とし、F 1 c を X 1 c とする請求項 3

のオリゴヌクレオチドを用意する工程

ii)オリゴヌクレオチドのF2を領域F2cにアニールさせて合成起点とし、鋳型に相補的な塩基配列を持つ第1の核酸を合成する工程

iii)工程ii)で合成された第1の核酸の少なくとも領域R2cを塩基対結合が可能な状態とする工程、

iv)工程iii)における第1の核酸の領域R2cに相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドを合成起点として第2の核酸を合成し、その3'末端のF1を塩基対結合が可能な状態とする工程

【請求項5】工程iv)におけるオリゴヌクレオチドが、領域R2cをX2cとし、R1cをX1cとする請求項3のオリゴヌクレオチドである請求項4の方法。

【請求項6】工程iii)およびiv)における塩基対結合が可能な状態とする工程を、鋳型におけるF2cの更に3'側にアニールするアウタープライマー、および第1の核酸における領域R2cの更に3'側にアニールするアウタープライマーを合成起点とする鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる鎖置換相補鎖合成によって行う請求項4の方法。

【請求項7】反応に用いる各オリゴヌクレオチドと鋳型におけるその相補領域との融解温度が、同じストリンジェンシーの元で次の関係にある請求項6の方法。

(アウタープライマー／鋳型における3'側の領域) \leq (F2c／F2およびR2c／R2) \leq (F1c／F1およびR1c／R1)

【請求項8】鋳型となる核酸がRNAであり、工程ii)における相補鎖合成を逆転写酵素活性を持つ酵素で行う請求項4-7のいずれかの方法。

【請求項9】請求項2に続いて次の工程を繰り返すことによって1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を増幅する方法。

A) 3'末端のR1が同一鎖上のR1cにアニールすることによって形成されるループに含まれる領域R2cに対して、R2cに相補的な塩基配列を3'末端を含むオリゴヌクレオチドをアニールさせ、これを合成起点として鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる相補鎖合成を行う工程、

B) 工程A)において置換され塩基対結合が可能となる3'末端のR1を再び同一鎖上のR1cにアニールさせて領域R2cを含むループを形成すると共に、R1

を合成起点として鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる相補鎖合成を行って、工程A)において合成された相補鎖を置換することによって1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を生成する工程

【請求項10】工程A)におけるオリゴヌクレオチドがR2cをX2cとし、R1cをX1cとする請求項3のオリゴヌクレオチドである請求項9の方法

【請求項11】請求項2に続いて次の工程D)を行い、

D)工程d)によって置換された相補鎖の3'末端R1を同一鎖上のR1にアニールさせて相補鎖合成を行い、このときに形成されるループに含まれる領域R2cに対して、R2cに相補的な塩基配列を3'末端に含むオリゴヌクレオチドをアニールさせ、これを合成起点として鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる相補鎖合成を行い、先に合成された3'末端にF1を備えた相補鎖を置換する工程、

更に次の工程を繰り返すことによって1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を増幅する方法。

E)3'末端のF1が同一鎖上のF1cにアニールすることによって形成されるループに含まれる領域F2cに対して、F2cに相補的な塩基配列を3'末端に含むオリゴヌクレオチドをアニールさせ、これを合成起点として鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる相補鎖合成を行う工程、

F)工程E)において置換され塩基対結合が可能となる3'末端のF1を再び同一鎖上のF1cにアニールさせて領域F2cを含むループを形成すると共に、F1を合成起点として鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる相補鎖合成を行って、工程E)において合成された相補鎖を置換することによって1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を生成する工程

【請求項12】工程E)におけるオリゴヌクレオチドがF2cをX2cとし、F1cをX1cとする請求項3のオリゴヌクレオチドである請求項11の方法

【請求項13】請求項10と請求項12の方法を並行して行わせることによって1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を増幅する方法。

【請求項14】以下の工程を含む1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を増幅する方法。

I) 鋳型となる核酸を与える工程; ただし鋳型となる核酸における少なくとも下記オリゴヌクレオチドがアニールすべき領域 F2c および F3c は塩基対結合が可能な状態とする、

II) 鋳型となる核酸を以下の成分と接触させ、下記の領域 F2c/F2間、R2c/R2間、F1c/F1間、そして R1c/R1間で安定な塩基対結合が形成できる条件下でインキュベートする工程

i) 鋳型となる核酸における領域 F2c を X2c とする請求項 3 のオリゴヌクレオチド

ii) i) のオリゴヌクレオチドを合成起点として合成された鋳型となる核酸に対する相補鎖における領域 R2c を X2c とする請求項 3 のオリゴヌクレオチド

iii) 鋳型となる核酸の領域 F2c の 3' 側に位置する領域 F3c に相補的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

iv) i) のオリゴヌクレオチドを合成起点として合成された鋳型となる核酸に対する相補鎖における領域 R2c の 3' 側に位置する領域 R3c に相補的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

v) 鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒する DNA ポリメラーゼ、および

vi) v) の基質となるヌクレオチド

【請求項 15】 請求項 8-14 のいずれかの方法を行い、増幅反応生成物が生じたかどうかを観察することにより試料中の標的塩基配列を検出する方法。

【請求項 16】 核酸の検出剤存在下で請求項 8-14 のいずれかの方法を行い、検出剤のシグナル変化に基づいて増幅反応生成物が生じたかどうかを観察する請求項 15 の方法。

【請求項 17】 以下の要素を含む、1 本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸の合成用キット。

i) 鋳型となる核酸の領域 F2c を X2c とし、F2c の 5' 側に位置する F1c を X1c とする請求項 3 のオリゴヌクレオチド

ii) i) のオリゴヌクレオチドをプライマーとして合成された相補鎖における領域 R2c に相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチド

iii) 鋳型となる核酸の領域 F2c の 3' 側に位置する領域 F3c に相補的な塩基配

列を持つオリゴヌクレオチド

iv)鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒するDNAポリメラーゼ、および

v)要素iv)の基質となるヌクレオチド

【請求項18】ii)のオリゴヌクレオチドが、i)のオリゴヌクレオチドを合成起点として合成された相補鎖における領域R2cをX2cとし、R2cの5'に位置するR1cをX1cとする請求項3のオリゴヌクレオチドである請求項17のキット

【請求項19】更に付加的に以下の要素を含む、請求項17または18のキット

vi)鋳型となる核酸の領域F2cの3'側に位置する領域F3cに相補的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

vii)i)のオリゴヌクレオチドを合成起点として合成された相補鎖における領域R2cの3'側に位置する領域R3cに相補的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

【請求項20】請求項17-19のいずれかのキットに、更に付加的に核酸合成反応の生成物を検出するための検出剤を含む、標的塩基配列の検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸の増幅方法として有用な、特定の塩基配列で構成される核酸を合成する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

核酸塩基配列の相補性に基づく分析方法は、遺伝的な特徴を直接的に分析することが可能である。そのため、遺伝的疾患、癌化、微生物の識別等には非常に有力な手段である。また遺伝子そのものを検出対象とするために、例えば培養のような時間と手間のかかる操作を省略できる場合もある。

【0003】

とはいえ試料中に存在する目的の遺伝子量が少ない場合の検出は一般に容易ではなく、標的遺伝子そのものを、あるいは検出シグナル等を増幅することが必要

となる。標的遺伝子を増幅する方法の一つとしてPCR(Polymerase Chain Reaction)法が知られている(Science, 230, 1350-1354, 1985)。PCR法は、in vitroにおける核酸の増幅技術として現在最も一般的な方法である。その指数的な増幅効果に基づく高い感度により優れた検出方法として定着した。また、増幅生成物をDNAとして回収できることから、遺伝子クローニングや構造決定などの遺伝子工学的手法を支える重要なツールとして幅広く応用されている。しかしPCR法においては、実施のために特別な温度調節装置が必要なこと；増幅反応が指数的に進むことから定量性に問題があること；試料や反応液が外部からの汚染を受け、誤って混入した核酸が鋳型として機能してしまうコンタミネーションの影響を受け易いこと等の問題点が指摘されている。

【0004】

一方リガーゼに基づく核酸合成方法も実用化されている。LCR法(Ligase Chain Reaction, Laffler TG; Carrino JJ; Marshall RL; Ann Biol Clin (Paris), 1993, 51:9, 821-6)は、検出対象となる配列上において隣接する2つのプローブをアニールさせ、リガーゼによって両者を連結する反応が基本原理になっている。標的塩基配列が存在しない場合には2つのプローブを連結することはできないので、連結生成物の存在は標的塩基配列の指標となる。LCR法も合成した相補鎖と鋳型との分離に温度制御が必要となることから、PCR法と同じ問題点を伴っている。LCRについては、隣接するプローブの間にギャップを設け、これをDNAポリメラーゼで充填する工程を加え特異性を改善する方法も報告されている。しかし、この改良方法によって期待できるのは特異性のみであり、温度制御を要求する点については依然として課題を残している。しかも、必要な酵素が増えるため、コストを犠牲にしているといえる。

【0005】

検出対象配列を鋳型として相補的な配列を持つDNAを増幅する方法には、SDA法(Strand Displacement Amplification) [Pro.N.A.S., 89, 392-396; 1992] [Nucleic Acid Res., 20, 1691-1696; 1992] と呼ばれる方法も知られている。SDA法は、ある塩基配列の3'側に相補的なプライマーを合成起点として相補鎖合成を行うときに、5'側に2本鎖の領域があるとその2本鎖を置換しながら相補鎖の合成を行う特殊

なDNAポリメラーゼを利用する方法である。なお以下本明細書において単に5'側、あるいは3'側と表現するときには、いずれも鋳型となっている方の鎖における方向を意味している。5'側の2本鎖部分が新たに合成された相補鎖によって置換(displacement)されることからSDA法と呼ばれている。SDA法では、プライマーとしてアニールさせた配列に予め制限酵素認識配列を挿入しておくことによって、PCR法においては必須となっている温度変化工程の省略を実現できる。すなわち、制限酵素によってもたらされるニックが相補鎖合成の起点となる3'-OH基を与え、そこから鎖置換合成を行うことによって先に合成された相補鎖が1本鎖として遊離して次の相補鎖合成の鋳型として再利用される。このようにSDA法はPCR法で必須となっていた複雑な温度制御を不要とした。しかし、SDA法では鎖置換型のDNAポリメラーゼに加え、必ずニックをもたらし制限酵素を組み合わせる必要がある。必要な酵素が増えるということは、コストアップの要因である。また、用いる制限酵素によって2本鎖の切断ではなくニックの導入(すなわち一方の鎖だけの切断)を行うために、一方の鎖には酵素消化に耐性を持つように合成の際の基質として α チオdNTPのようなdNTP誘導體を利用しなければならない。このため、SDAによる増幅産物は天然の核酸とは異なった構造となり、制限酵素による切断や、増幅産物の遺伝子クローニングへの応用といった利用は制限される。またこの点においてもコストアップの要因を伴っているといえる。加えて、未知の配列に対してSDA法を利用するときには、合成される領域の中にニックの導入のための制限酵素認識配列が存在する可能性を否定できず、非特異的な反応の恐れが常に伴う。

【0006】

複雑な温度制御を不要とする核酸の増幅方法として、NASBA(Nucleic Acid Sequence-based Amplification、TMA/Transcription Mediated Amplification法とも呼ばれる)が公知である。NASBAは、標的RNAを鋳型としてT7プロモーターを付加したプローブでDNAポリメラーゼによるDNA合成を行い、これを更に第2のプローブで2本鎖とし、生成する2本鎖DNAを鋳型としてT7RNAポリメラーゼによる転写を行わせて多量のRNAを増幅する反応系である(Nature, 350, 91-92, 1991)。NASBAは2本鎖DNAを完成するまでにいくつかの加熱変性工程を要求するが、以降のT7

RNAポリメラーゼによる転写反応は等温で進行する。しかし、逆転写酵素、RNase H、DNAポリメラーゼ、そしてT7RNAポリメラーゼといった複数の酵素の組み合わせが必須となることから、SDAと同様にコストの面では不利である。このように公知の核酸増幅反応においては、複雑な温度制御の問題点、あるいは複数の酵素が必要となることといった課題が残されている。

【0007】

更に、これらの公知の核酸合成反応について、特異性やコストを犠牲にすることなく核酸の合成効率を更に向上させる試みについては、ほとんど報告が無い。たとえば、RCA(Rolling-circle amplification)と呼ばれる方法では、標的塩基配列の存在下でパドロックプローブ(padlock probe)に相補的な塩基配列が連続した1本鎖のDNAを継続して合成できることが示された(Paul M.Lizardi et al, *nature genetics* 19, 225-232, July,1998)。RCAでは、1本のオリゴヌクレオチドの5'末端と3'末端がLCRにおける隣接プローブを構成する特殊な構造のパドロックプローブが利用される。そして鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼを組み合わせることにより、標的塩基配列の存在下でライゲーションされ環化したパドロックプローブを鋳型とする連続的な相補鎖合成反応がトリガーされる。同じ塩基配列からなる領域が繰り返し連続した構造を持った1本鎖核酸が生成される。この1本鎖核酸に対して更にプライマーをアニールさせてその相補鎖の合成を行って、高度な増幅を実現している。しかし、複数の酵素が必要な点は依然として残された課題である。また、相補鎖合成のトリガーは、2つの隣接領域の連結反応に依存しており、その特異性は原理的にLCRと同じレベルである。

【0008】

3'-OHの供給という課題に対しては、3'末端に同一鎖上の塩基配列に相補的な配列を持たせ、末端でヘアピンループを形成させる方法が公知である(Gene 71,29-40,1988)。このようなヘアピンループからは、自身を鋳型とした相補鎖合成が行われ、相補的な塩基配列で構成された1本鎖の核酸を生成する。たとえばPCT/FR95/00891では、相補的な塩基配列を連結した末端部分で同一鎖上にアニールする構造を実現している。しかしこの方法では、末端が相補鎖との塩基対結合を解

消して改めて同一鎖上で塩基対結合を構成するステップが必須である。このステップは塩基対結合を伴う相補的な塩基配列同士の間における微妙な平衡状態に依存して進むとされている。すなわち、相補鎖との塩基対結合と、同一鎖上での塩基対結合との間で維持される平衡状態を利用し、同一鎖上の塩基配列とアニールしたもののみが相補鎖合成の起点となる。したがって、高度な反応効率を達成するためには、厳密な反応条件の設定が求められるものと考えられる。更にこの先行技術においては、プライマー自身がループ構造を作っている。そのためプライマーダイマーがいったん生成すると、標的塩基配列の有無にかかわらず自動的に増幅反応が開始され非特異的な合成産物を形成してしまう。これは重大な問題点といえる。更に、プライマーダイマーの生成とそれに伴う非特異的な合成反応によるプライマーの消費が、目的とする反応の増幅効率の低下につながる。この他に、DNAポリメラーゼに対して鋳型とならない領域を利用して同一鎖にアニールする3'末端構造を実現した報告(EP713922)がある。この報告も末端部分における動的平衡を利用している点、あるいはプライマーダイマー形成にともなう非特異的な合成反応の可能性においては先のPCT/FR95/00891と同様の問題点を持つ。また、DNAポリメラーゼの鋳型とならない特殊な領域をプライマーとして用意しなければならない。

【0009】

また前記NASBAの原理を応用した各種のシグナル増幅反応においては、2本鎖のプロモーター領域を供給するためにしばしば末端でヘアピン状の構造を伴ったオリゴヌクレオチドが利用される(特開平5-211873)。しかしこれらは、相補鎖合成の3'-OHの連続的な供給を可能とするものではない。更に公表平10-510161(W096/17079)においては、RNAポリメラーゼによって転写されるDNA鋳型を得ることを目的として同一鎖上に3'末端をアニールさせたヘアピンループ構造が利用されている。この方法では、RNAへの転写と、RNAからDNAへの逆転写を利用して鋳型の増幅が行われる。しかし、この方法も複数の酵素を組み合わせなければ反応系を構成できない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、新規な原理に基づく核酸の合成方法を提供することである。より具体的には、低コストで効率的に配列に依存した核酸の合成を実現することができる方法を提供することである。すなわち、単一の酵素を用い、しかも等温反応条件の元でも核酸の合成と増幅を達成することができる方法の提供が、本発明の課題である。更に本発明は、公知の核酸合成反応原理では達成することが困難な高い特異性を実現することができる核酸の合成方法、並びにこの合成方法を応用した核酸の増幅方法の提供を課題とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、まず鎖置換型の相補鎖合成を触媒するポリメラーゼの利用が、複雑な温度制御に依存しない核酸合成に有用であることに着目した。このようなDNAポリメラーゼは、SDAやRCAでも利用された酵素である。しかし、たとえこのような酵素を用いたとしても、公知のプライマーに基づく手法では、たとえばSDAのように合成起点となる3'-OHを供給するために常に他の酵素反応が要求される。

そこで本発明者らは、公知のアプローチとはまったく異なる角度から3'-OHの供給について検討した。その結果、特殊な構造を持ったオリゴヌクレオチドを利用することによって、付加的な酵素反応に頼らずとも3'-OHの供給が可能となることを見出し本発明を完成した。すなわち本発明は、以下の核酸の合成方法、更にはこの核酸合成方法を応用した核酸の増幅方法、ならびにこれらの方法を可能とする新規なオリゴヌクレオチドに関する。

〔1〕以下の工程を含む1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸の合成方法。

- a) 同一鎖上の一部F1cにアニールすることができる領域F1を3'末端に備え、この領域F1がF1cにアニールすることによって、塩基対結合が可能な領域F2cを含むループを形成することができる核酸を与える工程
- b) F1cにアニールしたF1の3'末端を合成起点として相補鎖合成を行う工程
- c) 領域F2cに相補的な配列からなるF2を3'末端を含むオリゴヌクレオチドをアニールさせ、これを合成起点として鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメ

ラーゼによる相補鎖合成を行って、工程 b) で合成された相補鎖を置換する工程 d) 工程 c) で置換され塩基対結合が可能となった相補鎖における任意の領域 R 1 c に相補的な配列からなる R 1 をアニールさせ、その 3' 末端を合成起点として鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる相補鎖合成を行って、工程 c) で合成された相補鎖を置換する工程

〔2〕工程 d) において、合成起点が領域 R 1 c にアニールすることができる同一鎖上の 3' 末端に存在する領域 R 1 であり、R 1 が R 1 c にアニールすることによって塩基対結合が可能な領域 R 2 c を含むループが形成される〔1〕の方法。

〔3〕少なくとも以下の 2 つの領域 X 2 および X 1 c とで構成され、X 2 の 5' 側に X 1 c が連結されたオリゴヌクレオチド。

X 2 : 特定の塩基配列を持つ核酸の任意の領域 X 2 c に相補的な塩基配列を持つ領域

X 1 c : 特定の塩基配列を持つ核酸における領域 X 2 c の 5' 側に位置する領域 X 1 c と実質的に同じ塩基配列を持つ領域

〔4〕工程 a) における核酸が、以下の工程によって提供される第 2 の核酸である〔1〕の方法。

i) 鋳型となる核酸の領域 F 2 c を X 2 c とし、F 1 c を X 1 c とする〔3〕のオリゴヌクレオチドを用意する工程

ii) オリゴヌクレオチドの F 2 を領域 F 2 c にアニールさせて合成起点とし、鋳型に相補的な塩基配列を持つ第 1 の核酸を合成する工程

iii) 工程 ii) で合成された第 1 の核酸の少なくとも領域 R 2 c を塩基対結合が可能な状態とする工程、

iv) 工程 iii) における第 1 の核酸の領域 R 2 c に相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドを合成起点として第 2 の核酸を合成し、その 3' 末端の F 1 を塩基対結合が可能な状態とする工程

〔5〕工程 iv) におけるオリゴヌクレオチドが、領域 R 2 c を X 2 c とし、R 1 c を X 1 c とする〔3〕のオリゴヌクレオチドである〔4〕の方法。

〔6〕工程 iii) および iv) における塩基対結合が可能な状態とする工程を、鋳型における F 2 c の更に 3' 側にアニールするアウタープライマー、および第 1 の核

酸における領域 R 2 c の更に 3' 側にアニールするアウタープライマーを合成起点とする鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる鎖置換相補鎖合成によって行う〔4〕の方法。

〔7〕反応に用いる各オリゴヌクレオチドと鋳型におけるその相補領域との融解温度が、同じストリンジェンシーの元で次の関係にある〔6〕の方法。

$$(\text{アウタープライマー}/\text{鋳型における}3'\text{側の領域}) \leq (F 2 c / F 2 \text{ および } R 2 c / R 2) \leq (F 1 c / F 1 \text{ および } R 1 c / R 1)$$

〔8〕鋳型となる核酸が RNA であり、工程 ii) における相補鎖合成を逆転写酵素活性を持つ酵素で行う〔4〕-〔7〕のいずれかの方法。

〔9〕〔2〕に続いて次の工程を繰り返すことによって 1 本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を増幅する方法。

A) 3' 末端の R 1 が同一鎖上の R 1 c にアニールすることによって形成されるループに含まれる領域 R 2 c に対して、R 2 c に相補的な塩基配列を 3' 末端に含むオリゴヌクレオチドをアニールさせ、これを合成起点として鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる相補鎖合成を行う工程、

B) 工程 A) において置換され塩基対結合が可能となる 3' 末端の R 1 を再び同一鎖上の R 1 c にアニールさせて領域 R 2 c を含むループを形成すると共に、R 1 を合成起点として鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる相補鎖合成を行って、工程 A) において合成された相補鎖を置換することによって 1 本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を生成する工程

〔10〕工程 A) におけるオリゴヌクレオチドが R 2 c を X 2 c とし、R 1 c を X 1 c とする〔3〕のオリゴヌクレオチドである〔9〕の方法

〔11〕〔2〕に続いて次の工程 D) を行い、

D) 工程 d) によって置換された相補鎖の 3' 末端 R 1 を同一鎖上の R 1 にアニールさせて相補鎖合成を行い、このときに形成されるループに含まれる領域 R 2 c に対して、R 2 c に相補的な塩基配列を 3' 末端に含むオリゴヌクレオチドをアニールさせ、これを合成起点として鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる相補鎖合成を行い、先に合成された 3' 末端に F 1 を備えた相補鎖を置換する工程、

更に次の工程を繰り返すことによって1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を増幅する方法。

E) 3'末端のF1が同一鎖上のF1cにアニールすることによって形成されるループに含まれる領域F2cに対して、F2cに相補的な塩基配列を3'末端を含むオリゴヌクレオチドをアニールさせ、これを合成起点として鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる相補鎖合成を行う工程、

F) 工程E)において置換され塩基対結合が可能となる3'末端のF1を再び同一鎖上のF1cにアニールさせて領域F2cを含むループを形成すると共に、F1を合成起点として鎖置換相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼによる相補鎖合成を行って、工程E)において合成された相補鎖を置換することによって1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を生成する工程

〔12〕工程E)におけるオリゴヌクレオチドがF2cをX2cとし、F1cをX1cとする〔3〕のオリゴヌクレオチドである〔11〕の方法

〔13〕〔10〕と〔12〕の方法を並行して行わせることによって1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を増幅する方法。

〔14〕以下の工程を含む1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を増幅する方法。

I) 鋳型となる核酸を与える工程；ただし鋳型となる核酸における少なくとも下記オリゴヌクレオチドがアニールすべき領域F2cおよびF3cは塩基対結合が可能な状態とする、

II) 鋳型となる核酸を以下の成分と接触させ、下記の領域F2c/F2間、R2c/R2間、F1c/F1間、そしてR1c/R1間で安定な塩基対結合が形成できる条件下でインキュベートする工程

i) 鋳型となる核酸における領域F2cをX2cとする〔3〕のオリゴヌクレオチド

ii) i)のオリゴヌクレオチドを合成起点として合成された鋳型となる核酸に対する相補鎖における領域R2cをX2cとする〔3〕のオリゴヌクレオチド

iii) 鋳型となる核酸の領域F2cの3'側に位置する領域F3cに相補的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

iv)i)のオリゴヌクレオチドを合成起点として合成された鋳型となる核酸に対する相補鎖における領域 R 2 c の3' 側に位置する領域 R 3 c に相補的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

v)鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒するDNAポリメラーゼ、および

vi)v)の基質となるヌクレオチド

〔15〕〔8〕-〔14〕のいずれかの方法を行い、増幅反応生成物が生じたかどうかを観察することにより試料中の標的塩基配列を検出する方法。

〔16〕核酸の検出剤存在下で〔8〕-〔14〕のいずれかの方法を行い、検出剤のシグナル変化に基づいて増幅反応生成物が生じたかどうかを観察する〔15〕の方法。

〔17〕以下の要素を含む、1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸の合成用キット。

i)鋳型となる核酸の領域 F 2 c を X 2 c とし、F 2 c の5' 側に位置する F 1 c を X 1 c とする〔3〕のオリゴヌクレオチド

ii)i)のオリゴヌクレオチドをプライマーとして合成された相補鎖における領域 R 2 c に相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチド

iii)鋳型となる核酸の領域 F 2 c の3' 側に位置する領域 F 3 c に相補的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

iv)鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒するDNAポリメラーゼ、および

v)要素iv)の基質となるヌクレオチド

〔18〕ii)のオリゴヌクレオチドが、i)のオリゴヌクレオチドを合成起点として合成された相補鎖における領域 R 2 c を X 2 c とし、R 2 c の5' に位置する R 1 c を X 1 c とする〔3〕のオリゴヌクレオチドである〔17〕のキット

〔19〕更に付加的に以下の要素を含む、〔17〕または〔18〕のキット。

vi)鋳型となる核酸の領域 F 2 c の3' 側に位置する領域 F 3 c に相補的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

vii)i)のオリゴヌクレオチドを合成起点として合成された相補鎖における領域 R 2 c の3' 側に位置する領域 R 3 c に相補的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

〔20〕〔17〕-〔19〕のいずれかのキットに、更に付加的に核酸合成反応

の生成物を検出するための検出剤を含む、標的塩基配列の検出用キット。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明において合成の目的としている 1 本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸とは、1 本鎖上に互いに相補的な塩基配列を隣り合せて連結した核酸を意味する。更に本発明においては、相補的な塩基配列の間にループを形成するための塩基配列を含まなければならない。本発明においては、この配列をループ形成配列と呼ぶ。そして本発明によって合成される核酸は、実質的に前記ループ形成配列によって連結された互いに相補的な塩基配列で構成される。なお一般的には、それが部分的に塩基対結合を伴っているかどうかにかかわらず、塩基対結合を解離させたときに 2 つ以上の分子に分離しないものを 1 本鎖と呼ぶ。相補的な塩基配列は、同一鎖上で塩基対結合を形成することができる。本発明による 1 本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結した核酸を、同一鎖上で塩基対結合させることによって得ることができる分子内塩基対結合生成物は、見かけ上 2 本鎖を構成する領域と、塩基対結合を伴わないループ部分を与える。

【0013】

すなわち、本発明における 1 本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結した核酸とは、同一鎖上でアニールすることが可能な相補的な塩基配列を含み、そのアニール生成物は折れ曲がったヒンジ部分に塩基対結合を伴わないループを構成する 1 本鎖核酸と定義することもできる。そして塩基対結合を伴わないループには、相補的な塩基配列を持つヌクレオチドがアニールすることができる。ループ形成配列は任意の塩基配列であることができる。置換のための相補鎖合成を開始することができるように塩基対結合が可能であり、望ましくは特異的なアニーリングを達成するために他の領域に存在する塩基配列から識別可能な配列を備える。たとえば望ましい態様においては、鋳型となる核酸に由来し同一鎖上でアニールする領域（すなわち F1c や R1c）の更に 3' 側に位置する領域 F2c（あるいは R2c）と実質的に同じ塩基配列を含む。

【0014】

本発明において、実質的に同じ塩基配列とは、次のように定義される。すなわ

ち、ある配列を鋳型として合成された相補鎖が、目的の塩基配列に対してアニールし相補鎖合成の起点を与えるとき、このある配列は目的の塩基配列に対して実質的に同一である。たとえば F 2 に対して実質的に同一な塩基配列とは、F 2 とまったく同一な塩基配列に加えて、F 2 にアニールして相補鎖合成の起点となりうる塩基配列を与える鋳型として機能する塩基配列を含む。

【0015】

本発明による核酸を構成する相補的な塩基配列の数は、少なくとも 1 組である。本発明の望ましい態様によれば、その整数倍となることもある。そしてこの場合、理論的には本発明における前記核酸を構成する相補的な塩基配列のペアの数に上限はない。本発明の合成生成物である核酸が複数組の相補的な塩基配列で構成されるとき、この核酸は同じ塩基配列の繰り返しからなる。

【0016】

本発明によって合成される 1 本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結した核酸は、必ずしも天然の核酸と同じ構造を取る必要はない。核酸重合化酵素の作用によって核酸を合成するときに基質としてヌクレオチド誘導体を利用すれば、核酸の誘導体の合成が可能なのは公知である。このようなヌクレオチド誘導体には、ラジオアイソトープで標識したヌクレオチドや、ビオチンやジゴキシンのような結合性リガンドで標識したヌクレオチド誘導体などが用いられる。これらのヌクレオチド誘導体を用いることにより、生成物である核酸誘導体の標識が達成される。あるいは、蛍光性のヌクレオチドを基質として用いることによって、生成物である核酸を蛍光性の誘導体とすることができる。更にこの生成物は、DNA であることもできるし、RNA とすることもできる。いずれを生成するかは、プライマーの構造、重合のための基質の種類、そして核酸の重合を行う重合化試薬との組み合わせによって決定される。

【0017】

上記の構造を持った核酸の合成は、鎖置換活性を持った DNA ポリメラーゼと、3' 末端に同一鎖上の一部 F 1 c にアニールすることができる領域 F 1 を備え、この領域 F 1 が同一鎖上の F 1 c にアニールすることによって、塩基対結合が可能な領域 F 2 c を含むループを形成することができる核酸によって開始することが

できる。ヘアピンループを形成させて自身を鋳型(template)とする相補鎖合成反応の報告は多いが、本発明においてはヘアピンループ部分に塩基対結合を可能とする領域を備えており、この領域を相補鎖合成に利用している点において新規である。この領域を合成起点とすることにより、先に自身を鋳型として合成された相補鎖が置換されその3'側に存在する領域R1c(任意の領域)が塩基対結合可能な状態となる。このR1cに相補的な塩基配列を持つ領域がアニールして相補鎖合成を行われ、結果としてF1からR1cにいたる塩基配列とその相補鎖とがループ形成配列を介して交互に結合した核酸(2分子)が生成する。

【0018】

本発明の特徴となっている、3'末端に同一鎖上の一部F1cにアニールすることができる領域F1を備え、この領域F1が同一鎖上のF1cにアニールすることによって、塩基対結合が可能な領域F2cを含むループを形成することができる核酸は、様々な方法によって得ることができるが、もっとも望ましい態様においては次の構造を持ったオリゴヌクレオチドを利用した相補鎖合成反応に基づいて供給することができる。

【0019】

すなわち本発明において有用なオリゴヌクレオチドとは、少なくとも以下の2つの領域X2およびX1cとで構成され、X2の5'側にX1cが連結されたオリゴヌクレオチドからなる。

X2：特定の塩基配列を持つ核酸の領域X2cに相補的な塩基配列を持つ領域

X1c：特定の塩基配列を持つ核酸における領域X2cの5'側に位置する領域X1cと実質的に同じ塩基配列を持つ領域

ここで、本発明のオリゴヌクレオチドの構造を決定する特定の塩基配列を持つ核酸とは、本発明のオリゴヌクレオチドをプライマーとして利用するときに、その鋳型となる核酸を意味する。本発明の合成方法に基づいて核酸の検出を行う場合には、特定の塩基配列を持つ核酸とは、検出対象、あるいは検出対象から誘導された核酸である。特定の塩基配列を持つ核酸は、少なくともその一部の塩基配列が明らかとなっている、あるいは推測が可能な状態にある核酸を意味する。塩基配列を明らかにすべき部分とは、前記領域X2cおよびその5'側に位置する領

域 X1 c である。この 2 つの領域は、連続する場合、そして離れて存在する場合とを想定することができる。両者の相対的な位置関係により、生成物である核酸が自己アニールしたときに形成されるループ部分の状態が決定される。また、生成物である核酸が分子間のアニールではなく自己アニールを優先的に行うためには、両者の距離が不必要に離れないほうが望ましい。したがって、両者の位置関係は、0-500塩基分の距離を介して連続するようにするのが望ましい。ただし、後に述べる自己アニールによるループの形成において、両者があまりにも接近している場合には望ましい状態のループの形成を行うには不利となるケースも予想される。ループにおいては、新たなオリゴヌクレオチドのアニールと、それを合成起点とする鎖置換を伴う相補鎖合成反応がスムーズに開始できる構造が求められる。

【0020】

なお本発明に基づくオリゴヌクレオチドを構成する塩基配列の特徴付けのために用いられる同一、あるいは相補的という用語は、いずれも完全に同一、あるいは完全に相補的であることを意味しない。すなわち、ある配列と同一とは、ある配列に対してアニールすることができる塩基配列に対して相補的な配列をも含むことができる。他方、相補的とは、ストリンジェントな条件下でアニールすることができ、相補鎖合成の起点となる 3' 末端を提供することができる配列を意味する。

【0021】

上記特定の塩基配列を持つ核酸に対して本発明によるオリゴヌクレオチドを構成する領域 X2 および X1 c は、通常は重複することなく連続して配置される。あるいはもしも両者の塩基配列に共通の部分があるのであれば、部分的に両者を重ねて配置することもできる。X2 はプライマーとして機能する必要があることから、常に 3' 末端となるようにしなければならない。一方 X1 c は、後に述べるように、これを鋳型として合成された相補鎖の 3' 末端にプライマーとしての機能を与える必要があることから、5' 末端に配置する。このオリゴヌクレオチドを合成起点として得られる相補鎖は、次のステップにおいては逆向きからの相補鎖合成の鋳型となり、最終的には本発明によるオリゴヌクレオチド部分も鋳型として

相補鎖に写し取られる。写し取られることによって生じる3'末端は塩基配列X1を備えており、同一鎖上のX1cにアニールするとともに、ループを形成する。

【0022】

本発明においてオリゴヌクレオチドとは、相補的な塩基対結合を形成できること、そしてその3'末端において相補鎖合成の起点となる-OH基を与えること、の2つの条件を満たすものを意味する。したがって、そのバックボーンは必ずしもホスホジエステル結合によるものに限定されない。たとえばPではなくSをバックボーンとしたホスホチオエート体やペプチド結合に基づくペプチド核酸からなるものであることもできる。また、塩基は、相補的な塩基対結合を可能とするものであれば良い。天然の状態では、一般にはACTGおよびUの5種類となるが、たとえばブロモデオキシウリジン(bromodeoxyuridine)といった類似体であることもできる。本発明に用いるオリゴヌクレオチドは、合成の起点となるのみならず、相補鎖合成の鋳型としても機能するものであることが望ましい。

【0023】

本発明によるオリゴヌクレオチドは、以下に述べる各種の核酸合成反応において、与えられた環境の元で必要な特異性を維持しながら相補鎖との塩基対結合を行うことができる程度の鎖長を持つ。具体的には、5-200塩基、より望ましくは10-50塩基対とする。配列依存的な核酸合成反応を触媒する公知のポリメラーゼが認識するプライマーの鎖長が、最低5塩基前後であることから、アニールする部分の鎖長はそれ以上である必要がある。加えて、塩基配列としての特異性を期待するためには、確率的に10塩基以上の長さを利用するのが望ましい。一方、あまりにも長い塩基配列は化学合成によって調製することが困難となることから、前記のような鎖長が望ましい範囲として例示される。なお、ここで例示した鎖長はあくまでも相補鎖とアニールする部分の鎖長である。後に述べるように、本発明によるオリゴヌクレオチドは最終的には少なくとも2つの領域に個別にアニールすることができる。したがって、ここに例示する鎖長は、各領域の鎖長と理解すべきである。

【0024】

更に、本発明によるオリゴヌクレオチドは、公知の標識物質によって標識する

ことができる。標識物質としては、ジゴキシンやビオチンのような結合性リガンド、酵素、蛍光物質や発光物質、あるいは放射性同位元素などを示すことができる。あるいは、オリゴヌクレオチドを構成する塩基を蛍光性のアナログに置換する技術(W095/05391, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 91, 6644-6648, 1994)も公知である。

【0025】

この他本発明によるオリゴヌクレオチドは、それ自身を固相に結合させておくこともできる。あるいは、オリゴヌクレオチドの任意の部分にビオチンのような結合性のリガンドで標識しておき、これを固相化アビジンのような結合パートナーによって間接的に固相化することもできる。固相化オリゴヌクレオチドを合成開始点とする場合には、核酸の合成反応生成物が固相に捕捉されることから、分離が容易となる。分離された生成物に対して、核酸特異的な指示薬や、あるいは更に標識プローブを反応させることによって、検出を行うこともできる。あるいは、任意の制限酵素で消化することによって、目的とする核酸の断片を回収することもできる。

【0026】

本発明において用いられる鑄型という用語は、相補鎖合成の鑄型となる側の核酸を意味する。鑄型に相補的な塩基配列を持つ相補鎖は、鑄型に対応する鎖としての意味を持つが、両者の関係はあくまでも相対的なものに過ぎない。すなわち、相補鎖として合成された鎖は、再び鑄型として機能することができる。つまり、相補鎖は鑄型になることができる。

【0027】

本発明に有用なオリゴヌクレオチドは前記2つの領域のみならず、更に付加的な領域を含むことができる。X2とX1cとがそれぞれ3'末端と5'末端に配置される一方、両者の間に任意の配列を介在させることが可能である。それは、たとえば制限酵素認識配列、RNAポリメラーゼが認識するプロモーター、あるいはリボザイムをコードするDNA等であることができる。制限酵素認識配列とすることにより、本発明の合成産物である1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を同じ長さを持った2本鎖核酸に切りそろえることができるようになる。

RNAポリメラーゼが認識するプロモーター配列を配置すれば、本発明の合成生成物を鋳型として更にRNAへの転写が行われる。このときに、更にリボザイムをコードするDNAを配置すれば、転写生成物を自身で切断する系が実現する。なお、これらの付随的な塩基配列はいずれも2本鎖となった場合に機能するものである。したがって、本発明による1本鎖の核酸がループを形成しているときには、これらの配列は機能しない。核酸の伸長が進み、ループを含まない状態で相補的な塩基配列を持つ鎖とアニールした状態になったときにはじめて機能する。

【0028】

本発明に基づくオリゴヌクレオチドに対して、合成された領域の転写を可能とする方向でプロモーターを組み合わせた場合、同じ塩基配列を繰り返す本発明に基づく反応生成物は、高度に効率的な転写系を実現する。これを適当な発現系と組み合わせることによって、タンパク質への翻訳も可能である。すなわち、細菌や動物細胞内で、あるいはin vitroでの転写とタンパク質への翻訳に利用することができる。

上記のような構造の本発明によるオリゴヌクレオチドは、化学的に合成することができる。あるいは天然の核酸を制限酵素などによって切断し、上記のような塩基配列で構成されるように改変する、あるいは連結することも可能である。

【0029】

本発明による核酸の合成方法において有用な上記オリゴヌクレオチドを利用し、鎖置換活性を持ったDNAポリメラーゼと組み合わせて合成を行う反応について、基本的な原理を図5-6を参考にしながら以下に説明する。上記オリゴヌクレオチドは、まずX2 (F2に相当) が鋳型となる核酸にアニールし相補鎖合成の起点となる。得られた相補鎖に対して更に相補鎖合成を行うと、このとき合成される核酸の3'末端部分は、本発明によるオリゴヌクレオチドに相補的な塩基配列を持つ。本発明のオリゴヌクレオチドは、その5'末端部分に領域X1c (F1cに相当) と同じ配列を持つことから、このとき合成される核酸の3'末端部分はその相補配列X1 (F1) を持つことになる。ここで3'末端部分が塩基対結合が可能な状態となると、3'末端のX1 (F1) は、同一鎖上のX1c (F1c) にアニールし、その3'側に位置するX2c (F2c) を塩基対結合を伴わないループ

として残す。このループには本発明によるオリゴヌクレオチドのX2 (F2) がアニールし、これを合成起点とする相補鎖合成が行われる(図5-B)。このとき、先に合成された自身を鋳型とする相補鎖合成反応の生成物が、鎖置換反応によって置換され塩基対結合が可能な状態となる。

【0030】

本発明によるオリゴヌクレオチドを1種類、そしてこのオリゴヌクレオチドをプライマーとして合成された相補鎖を鋳型として核酸合成を行うことが可能な任意のリバースプライマーを用いた基本的な構成によって、図6に示すような複数の核酸合成生成物を得ることができる。図6からわかるとおり、(D)が本発明において合成の目的となっている1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸である。他方の生成物(E)は、加熱変性などの処理によって1本鎖とすれば再び(D)を生成するための鋳型となる。また2本鎖状態にある核酸である生成物(D)は、もしも加熱変性などによって1本鎖にされた場合、もとの2本鎖とはならず高い確率で同一鎖内部でのアニールが起きる。なぜならば、同じ融解温度(T_m)を持つ相補配列ならば、分子間(inter-molecular)反応よりも分子内(intra-molecular)反応のほうがはるかに優先的に進むためである。同一鎖上でアニールした生成物(D)に由来する1本鎖は、それぞれが同一鎖内でアニールして(B)の状態に戻る。更にそれぞれが1分子ずつの(D)と(E)を与える。これらの工程を繰り返すことによって、1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を次々に合成していくことが可能である。1サイクルで生成される鋳型と生成物が指数的に増えていくので、たいへん効率的な反応となる。

【0031】

ところで図5-(A)の状態を実現するためには、はじめに合成された相補鎖を少なくともリバースプライマーがアニールする部分において塩基対結合が可能な状態にしなければならない。このステップは任意の方法によって達成することができる。すなわち、最初の鋳型に対して本発明のオリゴヌクレオチドがアニールする領域F2cよりも更に鋳型上で3'側の領域F3cにアニールするアウタープライマー(F3)を別に用意する。このアウタープライマーを合成起点として鎖置換型の相補鎖合成を触媒するポリメラーゼによって相補鎖合成を行えば、本発

明の前記F2cを合成開始点として合成された相補鎖は置換され、やがてR2がアニールすべき領域R2cを塩基対結合が可能な状態とする(図5)。鎖置換反応を利用することによって、ここまでの反応を等温条件下で進行させることができる。

【0032】

アウタープライマーを利用する場合には、F2cからの合成よりも後にアウタープライマー(F3)からの合成が開始されるように両者の融解温度(T_m)を次のように調整するのが有利である。すなわち、 $(\text{アウタープライマーF3} : \text{F3c}) \leq (\text{F2c} / \text{F2}) \leq (\text{F1c} / \text{F1})$ 、あるいは $(\text{アウタープライマー} / \text{鋳型における3'側の領域}) \leq (\text{X2c} : \text{X2}) \leq (\text{X1c} : \text{X1})$ である。このような関係とすることにより、確率的に理想的な反応条件を達成することができる。融解温度(T_m)は、他の条件が一定であればアニールする相補鎖の長さや塩基対結合を構成する塩基の組み合わせによって理論的に算出することができる。したがって、本明細書の開示に基づいて望ましい条件を導くことは、当業者にとって困難なことではない。更にアウタープライマーのアニールのタイミングを調整するために、スタッキングと呼ばれる現象を応用することもできる。スタッキングとは、単独ではアニールすることができないオリゴヌクレオチドが2本鎖部分に隣接することによってアニールが可能となる現象である。つまり、アウタープライマーをF2c(X2c)に隣接させ、単独ではアニールできないように設計しておくのである。こうすれば、F2c(X2c)がアニールしたときに初めてアウタープライマーのアニールが可能となるので、必然的にF2c(X2c)のアニールが優先されることになる。この原理に基づいて、一連の反応にプライマーとして必要なオリゴヌクレオチドの塩基配列を設定した例が実施例に記載されている。なお、この工程は加温による変性や、DNAヘリカーゼによって達成することもできる。

【0033】

F2c(X2c)を持つ鋳型核酸がRNAの場合には、異なる方法により図5-(A)の状態を実現することもできる。たとえば、このRNA鎖を分解してしまえば、R1は塩基対結合が可能な状態となる。すなわち、F2をRNAのF2cにアニー

ルさせ、逆転写酵素によってDNAとして相補鎖合成を行う。次いで鋳型となったRNAをアルカリ変性やDNA/RNA 2本鎖のRNAに作用するリボヌクレアーゼによる酵素処理によって分解すれば、F2から合成したDNAは1本鎖となる。DNA/RNA 2本鎖のRNAを選択的に分解する酵素には、RNaseHや、一部の逆転写酵素が備えているリボヌクレアーゼ活性を利用することができる。こうして塩基対結合を可能としたR1cにリバースプライマーをアニールさせることができる。したがってR1を塩基結合可能な状態とするためのアウトプライマーが不要となる。

【0034】

あるいは逆転写酵素が備えている鎖置換活性を利用して、先に述べたアウトプライマーによる鎖置換を行うこともできる。この場合は逆転写酵素のみで反応系を構成することができる。すなわち、RNAを鋳型として、そのF2cにアニールするF2からの相補鎖合成、更にその3'側に位置するF3cにアニールするアウトプライマーF3を合成起点とする相補鎖合成と置換とが、逆転写酵素で可能となる。逆転写酵素がDNAを鋳型とする相補鎖合成反応を行うものであれば、置換された相補鎖を鋳型としてそのR2cにアニールするR2を合成起点とする相補鎖合成、そして3'側に位置するR3cにアニールするR3を合成起点とする相補鎖合成と置換反応をも含めてすべての相補鎖合成反応が逆転写酵素によって進行する。あるいは、与えられた反応条件の元で逆転写酵素にDNA/DNA鎖の置換活性が期待できないときには、先に述べた鎖置換活性を持ったDNAポリメラーゼを組み合わせて用いても良い。以上のように、RNAを鋳型として第1の1本鎖核酸を得るという態様は、本発明における望ましい態様を構成する。

【0035】

さて、以上のような反応系は前記リバースプライマーとして特定の構造を持つものを利用することによって、本発明に固有の様々なバリエーションをもたらす。もっとも効果的なバリエーションについて以下に述べる。すなわち、本発明のもっとも有利な態様においては、前記リバースプライマーとして、〔5〕に述べたような構成からなるオリゴヌクレオチドを用いるのである。このようなりバースプライマーの利用により、ループの形成とこのループ部分からの相補鎖合成と置換という一連の反応が、3'側と5'側の両方で起きようになる。これは、本発

明による 1 本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸の合成方法の合成効率を飛躍的に増大させると共に、一連の反応を等温で実施可能とするものである。以下に、この態様をまとめた図 1-図 3 に基づき、具体的に説明する。

【0036】

以下の態様においては、本発明に基づくオリゴヌクレオチドとして 2 種類を用意する。これを説明のために FA と RA と名づける。FA と RA を構成する領域は、以下のとおりである。ここで、F2 は鋳型となる核酸の領域 F2c に相補的な塩基配列である。また R2 は F2 をプライマーとして合成される相補鎖に含まれる任意の領域 R2c に相補的な塩基配列である。F1c と R1c はそれぞれ、F2c および R2c のそれぞれ下流に位置する任意の塩基配列である。ここで F2-R2 間の距離は任意であって良い。相補鎖合成を行う DNA ポリメラーゼの合成能力にも依存するが、好適な条件では 15kbp 程度の長さであっても十分に合成が可能である。より具体的には、Bst DNA ポリメラーゼを用いた場合、F2/R2c 間で 5kbp 程度の長さであれば確実に合成される。温度サイクルを伴う PCR では、温度変化ストレスによる酵素活性の低下が長い塩基配列の合成効率を下げるとされている。本発明における望ましい態様では、核酸増幅工程における温度サイクルが不要となるので、長い塩基配列であっても合成、ならびに増幅を確実に達成することができる。

	X2	X1c
FA	F2	F1c
RA	R2	R1c

【0037】

まず鋳型となる核酸に対して FA の F2 をアニールさせ、これを合成起点として相補鎖合成を行う。以下、図 1 の (4) にいたるまでは先に説明した本発明の基本的な態様 (図 5) と同様の反応工程となっている。図 1 の (2) で F3 としてアニールしている配列は、先に説明したアウトプライマーである。このプライマーを合成起点として鎖置換型の相補鎖合成を行う DNA ポリメラーゼで行うことにより、FA から合成した相補鎖は置換され、塩基対結合が可能な状態となる。

(4) で R2c が塩基対結合が可能な状態となったところで、リバースプライマ

ーとしてのRAがR2c/R2の組み合わせでアニールする。これを合成起点とする相補鎖合成は、FAの5'側末端であるF1cに至る部分まで行われる。この相補鎖合成反応に続いて、やはり置換用のアウタープライマーR3がアニールし、鎖置換を伴って相補鎖合成を行うことにより、RAを合成起点として合成された相補鎖が置換される。このとき置換される相補鎖は、RAを5'側に持ちFAに相補的な配列が3'末端に位置する。

【0038】

さて、こうして置換された1本鎖核酸の3'側には、同一鎖上のF1cに相補的な配列F1が存在する。同一分子内に並ぶ両者は速やかにアニールし、相補鎖合成を開始する。3'末端が同一鎖上のF1cにアニールするとき、同時にF2cを含むループが形成されている。このループ部分は塩基対結合が可能な状態で維持されていることは、図2-(7)からも明らかである。F2cに相補的な塩基配列を持つ本発明のオリゴヌクレオチドFAは、このループ部分にアニールして相補鎖合成の起点となる(7)。ループ部分からの相補鎖合成は、先に開始した相補鎖合成の反応生成物を置換しながら進む。その結果、自身を鋳型として合成された相補鎖は、再び3'末端において塩基対結合が可能な状態となる。この3'末端は、同一鎖上のR1cにアニールしうる領域R1を3'末端に備えており、やはり同一分子内の速やかな反応により両者は優先的にアニールする。こうして、先に説明したFAを鋳型として合成された3'末端からの反応が、この領域でも進行する。結果として、本発明による1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸は次々と相補鎖合成と置換とを継続し、その3'末端R1を起点とする伸長を続けることになる。3'末端R1の同一鎖へのアニールによって形成されるループには常にR2cが含まれることから、以降の反応でループ部分にアニールするのは常にR2を備えたオリゴヌクレオチド(すなわちRA)となる。

【0039】

一方、自分自身を鋳型として伸長を継続する1本鎖の核酸に対して、そのループ部分にアニールするオリゴヌクレオチドを合成起点として相補鎖合成される核酸に注目すると、ここでも本発明による1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸の合成が進行している。すなわち、ループ部分からの相補鎖合成は

、たとえば図2-(7)においては、RAに達した時点で完了する。そして、この核酸の合成によって置換された核酸が相補鎖合成を開始(図3-(8))すると、やがてその反応はかつて合成起点であったループ部分に達して再び置換が始まる。こうしてループ部分から合成を開始した核酸も置換され、その結果同一鎖上にアニールすることができる3'末端R1を得る(図3-(10))。この3'末端R1は同一鎖のR1cにアニールして相補鎖合成を開始する。さて、この反応のFとRを読みかえれば、図2-(7)で起きている反応と同じである。したがって図3-(10)に示す構造は、自身の伸長と新たな核酸の生成を継続する新しい核酸として機能することができる。なお図3-(10)に示す核酸から開始する核酸の合成反応は、ここまで述べてきたものとは逆に常に3'末端F1を合成起点とする伸長となる。すなわち本発明においては、1つの核酸の伸長に伴って、これとは別に伸長を開始する新たな核酸を供給しつづける反応が進行する。以上のようにリバースプライマーとして本発明に基づくオリゴヌクレオチドRAを組み合わせることによって、伸長とそれに伴う新たな核酸の生成、そしてこの新たに生成した核酸の伸長とそれに付随する更に新たな核酸の生成が、理論的には永久に継続し、きわめて効率的な核酸の増幅を達成することができる。

【0040】

このとき蓄積する反応生成物は、F1-R1間の塩基配列とその相補配列が交互に連結された構造を持つ。ただし繰り返し単位となっている配列の両端には、F2-F1(F2c-F1c)、またはR2-R1(R2c-R1c)の塩基配列で構成される領域が連続している。たとえば図3-(9)では、5'側から(R2-F2c)-(F1-R2c)-(R1-F1c)-(F2-R2c)という順序で連結された状態となる。これは、本発明に基づく増幅反応が、オリゴヌクレオチドを合成起点としてF2(またはR2)から開始し、続いて自身の3'末端を合成起点とするF1(またはR1)からの相補鎖合成反応によって伸長するという原理のもとに進行しているためである。

【0041】

さて、ここでは最も望ましい態様としてループ部分にアニールするオリゴヌクレオチドに本発明によるオリゴヌクレオチドFA、およびRAを用いた。しかし

本発明による核酸の増幅反応は、これらの限られた構造を持ったオリゴヌクレオチドのみならず、ループからの相補鎖合成を開始できるオリゴヌクレオチドを利用しさえすれば実施することができる。つまり、伸長を続ける3'末端はループからの相補鎖合成によって置換されさえすれば、再びループ部分を与える。ループ部分から開始する相補鎖合成は、常に1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を鋳型としていることから、本発明で目的としている核酸の合成が可能なのは自明である。ただし、ここで合成される核酸は、置換後にループを形成して相補鎖合成は行うものの、以降のループを形成するための3'末端を持たないため、新たな鋳型としては機能できなくなる。したがって、FA、あるいはRAによって合成を開始した核酸と違って指数的な増幅は期待できない。このような理由から、FAやRAのような構造を持ったオリゴヌクレオチドは、本発明に基づく高度に効率的な核酸の合成に有用なのである。

【0042】

一連の反応は、鋳型となる1本鎖の核酸に対して、以下の成分を加え、FAおよびRAを構成する塩基配列が相補的な塩基配列に対して安定な塩基対結合を形成することができ、かつ酵素活性を維持しうる温度でインキュベートするだけで進行する。したがって、PCRのような温度サイクルは必要無い。なおここでいう安定な塩基対結合とは、反応系に存在するオリゴヌクレオチドの少なくとも一部が相補鎖合成の起点を与えうる状態を意味する。安定な塩基対結合をもたらす望ましい条件は、たとえば融解温度(T_m)以下に設定することである。一般に融解温度(T_m)は、互いに相補的な塩基配列を持つ核酸の50%が塩基対結合した状態となる温度とされている。融解温度(T_m)以下に設定することは本発明の必須の条件ではないが、高度な合成効率を達成するためには考慮すべき反応条件の一つである。鋳型とすべき核酸が2本鎖である場合には、これを1本鎖とするための加熱変性が必要となるが、これは反応開始前の前処理として1度だけ行えば良い。

・4種類のオリゴヌクレオチド：

FA、

RA、

アウタープライマーF3

およびアウタープライマー R 3

- ・鎖置換型の相補鎖合成を行う DNA ポリメラーゼ、
- ・ DNA ポリメラーゼの基質となるヌクレオチド

この反応は、酵素反応に好適な pH を与える緩衝剤、酵素の触媒活性の維持やアニールのために必要な塩類、酵素の保護剤、更には必要に応じて融解温度 (T_m) の調整剤等の共存下で行う。緩衝剤としては、Tris-HCl 等の中性から弱アルカリ性に緩衝作用を持つものが用いられる。pH は使用する DNA ポリメラーゼに応じて調整する。塩類としては KCl、NaCl、あるいは $(NH_4)_2SO_4$ 等が、酵素の活性維持と核酸の融解温度 (T_m) 調整のために適宜添加される。酵素の保護剤としては、ウシ血清アルブミンや糖類が利用される。更に融解温度 (T_m) の調整剤には、ジメチルスルホキシド (DMSO) やホルムアミドが一般に利用される。融解温度 (T_m) の調整剤を利用することによって、前記オリゴヌクレオチドのアニールを限られた温度条件の元で調整することができる。あるいはベタイン (N,N,N-trimethylglycine) やテトラアルキルアンモニウム塩は、その isostabilize 作用によって鎖置換効率の向上に有効である。

【0043】

しかも一連の反応が、常に複数の領域の位置関係を維持した状態でなければ進行しないことが重要な特徴である。この特徴によって、非特異的な相補鎖合成に伴う非特異的な合成反応が効果的に防止できるのである。すなわち、たとえ何らかの非特異的な反応が起きたとしても、その生成物が以降の増幅工程に対して出発材料となる可能性を低く押さえることにつながるのである。またより多くの領域によって反応の進行が制御されているということは、類似した塩基配列の厳密な識別を可能とする検出系を自由に構成できる可能性をもたらす。この特徴を遺伝子変異の検出に利用することができる。本発明におけるアウタープライマーを用いる態様においては、このアウタープライマー 2 種、請求項 3 のオリゴヌクレオチドからなるプライマー 2 種の合計 4 種のプライマーが用いられている。すなわち 4 種のオリゴヌクレオチドに含まれる 6 領域が設計通りに働かなければ本発明の合成反応は進行しないのである。特に、相補鎖合成の起点となる各オリゴヌクレオチドの 3' 末端、および相補配列が合成起点となる X1 c 領域の 5' 末端の

配列は重要である。そこで、この重要な配列を検出すべき変異に対応するように設計すれば、本発明による合成反応生成物を観察することによって、変異の有無、あるいは遺伝子多型を総合的に分析することができる。これらの特徴は、たとえば単純に2つの領域で増幅反応を行っているPCR法などでは期待しにくい利点である。

更に請求項3のオリゴヌクレオチドを特徴付ける領域X1cは、相補配列が合成されてはじめて合成起点となり、この相補配列が、新たに合成された同一鎖内の配列X1にアニールすることにより、自己を鋳型とする合成反応が進行する。このため、たとえ先行技術で重要な問題となるいわゆるプライマーダイマーが生成しても、本オリゴヌクレオチドはプライマー内にはヘアピンループを持たないので、自己ループを形成できない。したがって、プライマーダイマーに起因する非特異的な増幅は原理的に生じ得ず、反応の特異性向上に貢献している。

【0044】

更に本発明によれば、F3（図1-(2)）やR3（図2-(5)）で示したアウトプライマーを組み合わせることによって、上記の一連の反応を等温条件下で行うことができる。すなわち本発明は、[14]に示した工程を含む1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸を増幅する方法を提供するものである。この方法では、F2c/F2間、R2c/R2間、F1c/F1間、そしてR1c/R1間で安定なアニールが起きる温度条件が選択され、そして望ましくはF3c/F3間、ならびにR3c/R3間は、それぞれF2c/F2間、ならびにR2c/R2間のアニールに助けられるスタッキング現象によってアニールするように設定される。

【0045】

本発明においては核酸の合成と増幅という用語を用いる。本発明における核酸の合成とは、合成起点となったオリゴヌクレオチドからの核酸の伸長を意味する。合成に加えて、更に他の核酸の生成と、この生成された核酸の伸長反応とが連続して起きるとき、一連の反応を総合して増幅という。

【0046】

さて、上記のような反応系を更に発展させると、本発明の特徴となっている、

3' 末端に同一鎖上の一部 F 1 c にアニールすることができる領域 F 1 を備え、この領域 F 1 が同一鎖上の F 1 c にアニールすることによって、塩基対結合が可能な領域 F 2 c を含むループを形成することができる 1 本鎖核酸は、次のような原理に基づいて提供することもできる。すなわち、予めこのような構造を持ったプライマーに基づいて相補鎖合成を進めるのである。具体的には、まず次の構造を持つプライマーを用意する。

5'-[プライマー内に位置する領域 x 1 c にアニールする領域 x 1] - [塩基対結合が可能な状態にあるループ形成配列] - [領域 x 1 c] - [鋳型に相補的な配列を持つ領域] -3'

鋳型に相補的な配列を持つ領域には、F 1 に相補的な塩基配列（プライマー f a）および R 1 c に相補的な塩基配列（プライマー r a）の 2 種類を用意する。なお、このとき合成すべき核酸を構成する塩基配列は、領域 F 1 から領域 R 1 c にいたる塩基配列と、この塩基配列に相補的な塩基配列を持つ領域 R 1 から領域 F 1 c にいたる塩基配列とを含むものである。一方、プライマー内部でアニールすることができる x 1 c と x 1 は、任意の配列とすることができる。ただしプライマー f a と r a の間では、領域 x 1 c / x 1 の配列を異なるものとするのが望ましい。

【0047】

まず鋳型核酸の領域 F 1 から前記プライマー f a による相補鎖合成を行う。次いで合成された相補鎖の領域 R 1 c を塩基対結合が可能な状態とし、ここに一方のプライマーをアニールさせて相補鎖合成の起点とする。このとき合成される相補鎖の 3' 末端は、最初に合成された鎖の 5' 末端部分を構成するプライマー f a に相補的な塩基配列を持つので、3' 末端には領域 x 1 を持ち、これが同一鎖上の領域 x 1 c にアニールするとともにループを形成する。こうして、前記本発明による特徴的な 3' 末端構造が提供され、以降の反応は最も望ましい態様として示した先の反応系そのものとなる。なおこのときループ部分にアニールするオリゴヌクレオチドは、3' 末端にループ内に存在する領域 x 2 c に相補的な領域 x 2 を持ち、5' 側には領域 x 1 を持つものとする。先の反応系ではプライマー F A と R A を使って鋳型核酸に相補的な鎖を合成することによって核酸の 3' 末端にループ構造

をもたらした。この方法は、短いプライマーで効果的に本発明に特徴的な末端構造を提供する。一方、本態様においては、プライマーとしてはじめからループを構成する塩基配列全体を提供しており、より長いプライマーの合成が必要となる。

【0048】

リバースプライマーに制限酵素認識領域を含む塩基配列を利用すれば、本発明による異なった態様を構成することができる。図6に基づき、リバースプライマーが制限酵素認識配列を含む場合について具体的に説明する。図6-(D)が完成したところで、リバースプライマー内の制限酵素認識部位に対応する制限酵素によりニックが生じる。このニックを合成起点として鎖置換型の相補鎖合成反応が開始する。リバースプライマーは(D)を構成する2本鎖核酸の両端に位置しているので、相補鎖合成反応も両端から開始することになる。基本的には先行技術として記載したSDA法の原理に基づくが、鋳型となる塩基配列が本発明によって相補的な塩基配列を交互に連結した構造となっているので、本発明に特有の核酸合成系が構成されるのである。なお、ニックを入れるリバースプライマーの相補鎖となる部分には制限酵素による2本鎖の切断が生じないようにヌクレアーゼ耐性となるようにdNTP誘導体を取りこまれるように設計しなければならない。

【0049】

リバースプライマーにRNAポリメラーゼのプロモーターを挿入しておくこともできる。この場合もSDA法を応用した先の態様と同様に、図6-(D)の両端からこのプロモーターを認識するRNAポリメラーゼにより転写が行われる。

【0050】

本発明によって合成された核酸は、1本鎖とは言え相補的な塩基配列から構成されるため、その大部分が塩基対結合を形成している。この特徴を利用して、合成生成物の検出が可能である。syber greenやpico greenのような2本鎖特異インターカレーターである蛍光色素の存在下で本発明による核酸の合成方法を実施すれば、生成物の増加に伴って蛍光強度の増大が観察される。これをモニターすれば、閉鎖系でリアルタイムな合成反応の追跡が可能である。この種の検出系はPCR法への応用も考えられているが、プライマーダイマー等によるシグナルの発

生と区別がつかないことから問題が多いとされている。しかし本発明に応用した場合には、非特異的な塩基対結合が増加する可能性が非常に低いことから、高い感度と少ないノイズが同時に期待できる。2本鎖特異インターカレーターと同様に、均一系の検出系を実現する方法として、蛍光エネルギー転移の利用が可能である。

【0051】

本発明による核酸の合成方法を支えているのは、鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒するDNAポリメラーゼである。上記反応中には、必ずしも鎖置換型のポリメラーゼを要しない反応ステップも含まれてはいる。しかし、構成試薬の単純化、そして経済性の点で、1種類のDNAポリメラーゼを利用するのが有利である。この種のDNAポリメラーゼには、以下のようなものが知られている。また、これらの酵素の各種変異体についても、それが配列依存型の相補鎖合成活性と鎖置換活性を有する限り、本発明に利用することができる。ここで言う変異体とは、酵素の必要とする触媒活性をもたらす構造のみを取り出したもの、あるいはアミノ酸の変異等によって触媒活性を改変したもの等を示すことができる。

Bst DNAポリメラーゼ

Bca(exo-)DNAポリメラーゼ

DNA ポリメラーゼ I のクレノウ・フラグメント

Vent DNAポリメラーゼ

Vent(Exo-)DNAポリメラーゼ (Vent DNAポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの)

DeepVent DNAポリメラーゼ

DeepVent(Exo-)DNAポリメラーゼ (DeepVent DNAポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの)

Φ29ファージDNAポリメラーゼ

MS-2ファージDNAポリメラーゼ

【0052】

これらの酵素の中でもBst DNAポリメラーゼやBca(exo-)DNAポリメラーゼは、ある程度の耐熱性を持ち、触媒活性も高いことから特に望ましい酵素である。本

発明の反応は、望ましい態様においては等温で実施することができるが、融解温度(T_m)の調整などのために必ずしも酵素の安定性にふさわしい温度条件を利用できるとは限らない。したがって、酵素が耐熱性であることは望ましい条件の一つである。また、等温反応が可能とは言え、最初の鋳型となる核酸の提供のためにも加熱変性は行われる可能性があり、その点においても耐熱性酵素の利用はアクセプトプロトコールの選択の幅を広げる。

Vent(Exo-)DNAポリメラーゼは、鎖置換活性と共に高度な耐熱性を備えた酵素である。ところでDNAポリメラーゼによる鎖置換を伴う相補鎖合成反応は、1本鎖結合タンパク質(single strand binding protein)の添加によって促進されることが知られている(Paul M.Lizardi et al, nature genetics 19, 225-232, July, 1998)。この作用を本発明に応用し、1本鎖結合タンパク質を添加することによって相補鎖合成の促進効果を期待することができる。たとえばVent(Exo-)DNAポリメラーゼに対しては、1本鎖結合タンパク質としてT4gene32が有効である。

なお3'-5'エクソヌクレアーゼ活性を持たないDNAポリメラーゼには、相補鎖合成が鋳型の5'末端に達した部分で停止せず、1塩基突出させた状態まで合成を進める現象が知られている。本発明では、相補鎖合成が末端に至ったときの3'末端の配列が次の相補鎖合成の開始につながるため、このような現象は望ましくない。しかし、DNAポリメラーゼによる3'末端への塩基の付加は、高い確率でAとなる。したがって、dATPが誤まって1塩基付加しても問題とならないように、3'末端からの合成がAで開始するように配列を選択すれば良い。また、相補鎖合成時に3'末端がたとえ突出してしまっても、これを消化してblunt endとする3'→5'エクソヌクレアーゼ活性を利用することもできる。たとえば、天然型のVent DNAポリメラーゼはこの活性を持つことから、Vent(Exo-)DNAポリメラーゼと混合して利用することにより、この問題を回避することができる。

【0053】

本発明による核酸の合成方法、あるいは増幅方法に必要な各種の試薬類は、あらかじめパッケージングしてキットとして供給することができる。具体的には、本発明のために、相補鎖合成のプライマーとして、あるいは置換用のアウトープライマーとして必要な各種のオリゴヌクレオチド、相補鎖合成の基質となるdNTP

、鎖置換型の相補鎖合成を行うDNAポリメラーゼ、酵素反応に好適な条件を与える緩衝液、更に必要に応じて合成反応生成物の検出のために必要な試薬類で構成されるキットが提供される。特に、本発明の望ましい態様においては、反応途中で試薬の添加が不要なことから、1回の反応に必要な試薬を反応容器に分注した状態で供給することにより、サンプルの添加のみで反応を開始できる状態とすることができる。発光シグナルや蛍光シグナルを利用して、反応生成物の検出を反応容器のままで行えるようなシステムとすれば、反応後の容器の開封を全面的に廃止することができる。これは、コンタミネーションの防止上、たいへん望ましいことである。

【0054】

さて、本発明によって合成される、1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸には、たとえば次のような有用性がある。第一には、相補的な塩基配列を1分子内に備えた特殊な構造に伴う利点の活用である。この特徴により、検出が容易となることが期待される。すなわち、相補的な塩基配列との塩基対結合に伴って、シグナルを増減する核酸の検出系が公知である。たとえば先に述べたような2本鎖特異インターカラーターを検出剤として利用する方法などを組み合わせれば、本発明の合成生成物の特徴を生かした検出系を実現することができる。このような検出系において本発明の合成反応生成物を一度熱変性して元の温度に戻すと、分子内のアニールが優先的に起きるため速やかに相補的配列の間で塩基対結合を構成する。一方、もしも非特異的反応生成物が存在していても、それは分子内に相補的配列を持っていないので熱変性により2分子以上に分離してしまい、すぐにはもとの二本鎖には戻れない。こうして、検出前に加熱変性工程を追加することによって、非特異反応に伴うノイズを軽減することができる。熱に対して耐性を持たないDNAポリメラーゼを使用しているときには、加熱変性工程は反応停止の意味も持ち、反応時間の制御の点で有利である。

【0055】

第二の特徴は、塩基対結合が可能な状態にあるループを常に形成することである。塩基対結合が可能な状態にあるループの構造を、図4に示した。図4からわかるように、ループはプライマーのアニールが可能な塩基配列 F 2 c (X 2 c)

と、 $F2c-F1c(X1c)$ の間に介在する塩基配列とで構成される。 $F2c-F1c$ 間(普遍的に示せば $X2c-X1c$ 間)の配列は、鋳型に由来する塩基配列である。したがってこの領域に対して相補的な塩基配列を持つプローブをアニールさせれば、鋳型特異的な検出を行うことができる。しかも、この領域は常に塩基対結合が可能な状態にあることから、アニールに先だって加熱変性する必要がない。

【0056】

ループとして常に塩基対結合が可能な領域を与える本発明による反応生成物は、この他にもさまざまな検出系を可能とする。たとえば、このループ部分に対するプローブを固定した表面プラズモン共鳴を利用した検出系が可能である。また、ループ部分に対するプローブを2本鎖特異的なインターカレーターで標識しておけば、より高感度な蛍光分析を行うことができる。あるいは、本発明によって合成される核酸が3'側と5'側の両方に塩基対結合が可能なループを形成することを積極的に利用することもできる。たとえば、一方のループを正常型と異常型で共通の塩基配列となる部分とし、他方のループに両者の違いが生じる領域となるように設計しておくのである。共通部分に対するプローブで遺伝子の存在を確認し、他方の領域で異常の有無を確認するといった特徴的な分析系を構成することができる。本発明による核酸の合成反応は、等温で進めることも可能なことから、一般的な蛍光光度計によってリアルタイムな分析が可能となることも特筆すべき利点である。これまでも同一鎖上にアニールする核酸の構造は公知である。しかし本発明によって得ることができる1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸は、他のオリゴヌクレオチドが塩基対結合することができるループ部分を含む点において新規である。

【0057】

【実施例】

実施例1 M13mp18内の領域の増幅

M13mp18を鋳型として、本発明による1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸の合成方法を試みた。実験に使用したプライマーは、M13FA、M13RA、M13F3、そしてM13R3の4種類である。M13F3とM13R3は、それぞれM13FAとM13RA

を合成起点として得られた第1の核酸を置換するためのアウタープライマーである。アウタープライマーはM13FA（あるいはM13RA）よりも後から相補鎖合成の起点となるべきプライマーなので、M13FA（あるいはM13RA）と隣接する領域にスタッキング現象を利用してアニールするように設計した。また、M13FA（あるいはM13RA）のアニールが優先的に起こるようにこれらのプライマー濃度を高く設定した。

【0058】

各プライマーを構成する塩基配列は配列表に示したとおりである。プライマーの構造的な特徴を以下にまとめた。また標的塩基配列(target)に対する各領域の位置関係を図7に示した。

プライマー 5'側の領域 / 3'側の領域

M13FA M13FAによる合成相補鎖の領域F1cと同じ
 /M13mp18の領域F2cに相補

M13RA M13RAによる合成相補鎖の領域R1cと同じ
 /M13FAによる合成相補鎖の領域R2cに相補

M13F3 M13mp18の領域F2cの3'側に隣接するF3cに相補

M13R3 M13FAによる合成相補鎖の領域R2cの3'側に隣接するR3cに相補

このようなプライマーによって、M13mp18の領域F1cからR1cにいたる領域とその相補的な塩基配列とが、F2cを含むループ形成配列を挟んで1本鎖上に交互に連結した核酸が合成される。これらのプライマーによる本発明による核酸の合成方法のための反応液組成を以下に示す。

【0059】

反応液組成 (25 μ L中)

20mM Tris-HCl pH8.8

10mM KCl

10mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

6mM MgSO_4

0.1% Triton X-100

5% ジメチルスルホキシド(DMSO)

0.4mM dNTP

プライマー：

800nM M13FA／配列番号：1

800nM M13RA／配列番号：2

200nM M13F3／配列番号：3

200nM M13R3／配列番号：4

ターゲット：M13mp18 dsDNA ／配列番号：5

【0060】

反応：上記反応液を95℃で5分間加熱し、ターゲットを変性させて1本鎖とした。反応液を氷水上に移し、Bst DNA ポリメラーゼ(NEW ENGLAND BioLabs)を4U 添加し、65℃で1時間反応させた。反応後、80℃10分間で反応を停止し再び氷水上に移した。

【0061】

反応の確認：上記反応液の5 μ L に1 μ Lのloading bufferを添加し、2%アガロースゲル(0.5% TBE)を使って、1時間、80mVで電気泳動した。分子サイズマーカーとして、XIV(100bp ladder, boehringer mannheim製)を使用した。泳動後のゲルをSYBRGreen I (Molecular Probes, Inc.)で染色して核酸を確認した。結果は図8に示すとおりである。各レーンは次のサンプルに対応している。

1. XIV size marker
2. 1fmol M13mp18 dsDNA
3. targetなし

レーン3では未反応のプライマーが染色されている以外にバンドは確認されなかった。レーン2はターゲットが存在する場合、低サイズのバンドのラダーと高サイズでのスメアな染色、およびゲル内でほとんど泳動されていないバンドとして生成物が確認された。低サイズのバンドのうち、290bp、450bp付近のバンドは、それぞれ本発明の合成反応により予想される産物である、配列番号：11および配列番号：12が2本鎖となったもの(図2-(7)および図2-(10)が2本鎖となったものに相当)および配列番号：13(図3-(9)にある長い1本鎖に相当)とサイズが一致することから、反応が予想されるとおりに進行していること

が確認された。高サイズのスメアなパターン、および泳動されていないバンドは、本反応が基本的に連続的な反応であることから、反応産物が一定のサイズにはならないこと、そして部分的な 1 本鎖、あるいは 2 本鎖の複合体を形成した複雑な構造をとまなっているため、結果としてこのような泳動結果を与えるものと考えられた。

【0062】

実施例 2 反応産物の制限酵素消化確認

実施例 1 で得られた本発明による 1 本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸の構造を明らかにすることを目的として、制限酵素による消化を行った。制限酵素を使った消化によって理論どおりの断片を生じる一方、実施例 1 で観察された高サイズのスメアなパターンや泳動されないバンドが消滅すれば、これらがいずれも本発明によって合成された 1 本鎖上に相補的な塩基配列を交互に連結した核酸であることが推定できる。

実施例 1 の反応液を 8 本分 (200 μ L) プールし、フェノール処理後、エタノール沈殿を行って精製した。この沈殿を回収して 200 μ L の TE 緩衝液で再溶解し、その 10 μ L を制限酵素 BamHI、PvuII、および HindIII でそれぞれ 37℃ 2 時間消化した。消化物を 2% アガロースゲル (0.5% TBE) を使って、1 時間、80mV で電気泳動した。分子サイズマーカーとして、SUPERLADDER-LOW (100bp ladder) (Gensura Laboratories, Inc. 製) を使用した。泳動後のゲルを SYBRGreen I (Molecular Probes, Inc.) で染色して核酸を確認した。結果は図 9 に示すとおりである。各レーンは次のサンプルに対応している。

1. SUPERLADDER-LOW (100bp ladder)
2. 精製物の BamHI 消化物
3. 精製物の PvuII 消化物
4. 精製物の HindIII 消化物

ここで比較的鎖長の短い増幅生成物を構成している塩基配列は、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、および配列番号：16 等と推定される。これらの塩基配列から、推測される各制限酵素消化断片のサイズは表 1 のとおりである。表中の L は、ループ (1 本鎖) を含む断片なので泳動位置が未確定である

ことを示す。

【0063】

【表 1】

配列番号	BamHI	PvuII	HindIII
1 3	177 +L	56 +L	147 +L
1 4	15+101 +L	-	142 +L
1 5	171+101 +L	56 +L	147+161 +L
1 6	11+101+230 +L	237 +L	142+170 +L
まとめ	101,177,230	56,237	142,147,161,170
	(11,15;確認できない)		

未消化でのバンドのほとんどが消化後には推定されるサイズのバンドへ変化したことから、目的の反応産物が増幅されていることが確認された。また非特異的産物はほとんどないことも示された。

【0064】

実施例 3 HBV遺伝子配列の増幅

HBV遺伝子の部分配列を組み込んだM13mp18 dsDNAを鋳型として、本発明による核酸の合成方法を試みた。実験に使用したプライマーは、HB65FA（配列番号：6）、HB65RA（配列番号：7）、HBF3（配列番号：8）、そしてHBR3（配列番号：9）の4種類である。HBF3とHBR3は、それぞれHB65FAとHB65RAを合成起点として得られた第1の核酸を置換するためのアウタープライマーである。アウタープライマーはHB65FA（あるいはHB65RA）よりも後から相補鎖合成の起点となるべきプライマーなので、HB65FA（あるいはHB65RA）と隣接する領域にスタッキング現象を利用してアニールするように設計した。また、HB65FA（あるいはHB65RA）のアニールが優先的に起こるようにこれらのプライマー濃度を高く設定した。M13mp1

8に組みこまれたHBVに由来する本実施例のターゲット配列(430bp)を配列10に示した。

【0065】

各プライマーを構成する塩基配列は配列表に示したとおりである。プライマーの構造的な特徴を以下にまとめた。また標的塩基配列(target)に対する各領域の位置関係を図10に示した。

プライマー 5' 側の領域 / 3' 側の領域

HB65FA HB65FAによる合成相補鎖の領域F1cと同じ

／HBV-M13mp18の領域F2cに相補

HB65RA HB65RAによる合成相補鎖の領域R1cと同じ

／HB65FAによる合成相補鎖の領域R2cに相補

HBF3 HBV-M13mp18の領域F2cの3'側に隣接するF3cに相補

HBR3 HB65FAによる合成相補鎖の領域R2cの3'側に隣接するR3cに相補

このようなプライマーによって、HBV遺伝子の部分配列を組み込んだM13mp18(HBV-M13mp18)の領域F1cからR1cにいたる領域とその相補的な塩基配列とが、F2cを含むループ形成配列を挟んで1本鎖上で交互に連結した核酸が合成される。上記プライマーを用いる他は実施例1と同じ条件で反応させ、その反応液をアガロース電気泳動により分析した。結果は図11に示すとおりである。各レーンは次のサンプルに対応している。

1. XIV size marker
2. 1 fmol HBV-M13mp18 dsDNA
3. targetなし

実施例 1 と同様に、targetが存在するときのみ、低サイズのバンドのラダーと高サイズでのスメアな染色、およびゲル内でほとんど泳動されていないバンドとして生成物が確認された（レーン 2）。低サイズのバンドのうち、310bp、および480bp付近のバンドはそれぞれ、本反応により予想される産物である、配列番号：17および配列番号：18の2本鎖とサイズが一致することから、反応が予想されたとおりに進行していることが確認された。高サイズのスメアなパターン、および泳動されていないバンドは、実施例 1 の結果で述べたように、本発明

に特徴的な合成生成物の構造が原因となっているものと推定された。この実験により、増幅する配列(target)が異なっても本発明を実施可能であることが確認された。

【0066】

実施例 4 合成反応生成物のサイズの確認

本発明に基づいて合成された核酸の構造を確認するために、その長さをアルカリ変性条件下での電気泳動によって分析した。実施例 1 と実施例 3 のターゲット存在下での反応液の 5 μ L に、それぞれ 1 μ L の alkaline loading buffer を添加し、0.7% アガロースゲル (50mM NaOH, 1mMEDTA) を使って、14 時間、50mA で電気泳動した。分子サイズマーカーとして、ラムダファージの HindIII 消化断片を使用した。泳動後のゲルを 1M Tris pH 8 で中和後、SYBRGreen I (Molecular Probes, Inc.) で染色して核酸を確認した。結果は図 12 に示す。各レーンは以下のサンプルに対応している。

1. ラムダファージの HindIII 消化断片
2. 実施例 1 の反応生成物
3. 実施例 3 の反応生成物

反応生成物をアルカリ変性条件で泳動すると 1 本鎖状態でのサイズ確認が可能である。実施例 1 (レーン 2)、実施例 3 (レーン 3) とともに主な生成物は 2 kb 以内であることが確認された。また、本発明による生成物はこの分析によって確認できる範囲で少なくとも 6 kb 以上にまで伸びていることが判明した。加えて、実施例 1 や実施例 3 の未変性条件下で泳動されなかったバンドは、変性状態では個々の 1 本鎖に分離されサイズが小さくなることが改めて確認された。

【0067】

実施例 5 M-13mp13 内の領域の増幅における、ターゲット濃度依存的増幅の確認

本発明による核酸の合成方法に及ぼす、ターゲットの濃度変化の影響を観察した。ターゲットである M13mp18 dsDNA を 0~1 fmol とし、反応時間を 1 時間および 3 時間とする他は、実施例 1 と同じ条件で本発明による核酸の合成方法を実施した。実施例 1 と同様に、2% アガロースゲル (0.5% TBE) で電気泳動し、SYBRGreen I (Molecular Probes, Inc.) 染色により核酸を確認した。分子サイズマーカー

ーとして、XIV(100bp ladder, boehringer mannheim)を使用した。結果は図 1 3 (上：反応時間 1 時間、下：反応時間 3 時間) に示した。各レーンは、次のサンプルに対応する。

1. M13mp18 dsDNA 1×10^{-15} mol/tube
2. M13mp18 dsDNA 1×10^{-16} mol/tube
3. M13mp18 dsDNA 1×10^{-17} mol/tube
4. M13mp18 dsDNA 1×10^{-18} mol/tube
5. M13mp18 dsDNA 1×10^{-19} mol/tube
6. M13mp18 dsDNA 1×10^{-20} mol/tube
7. M13mp18 dsDNA 1×10^{-21} mol/tube
8. M13mp18 dsDNA 1×10^{-22} mol/tube
9. target なし
10. XIV size marker

泳動像の下部に見られる各レーンに共通のバンドは未反応のプライマーが染色されたものである。反応時間にかかわらず、ターゲットが存在しないときは全く増幅産物は観察されない。ターゲット存在下でのみ、ターゲットの濃度依存的に増幅産物の染色パターンが得られた。また、反応時間を長くすることにより、より低濃度まで増幅産物が確認できた。

【0068】

【発明の効果】

本発明による新規なオリゴヌクレオチドとそれを用いた核酸の合成方法により、複雑な温度制御の不要な 1 本鎖上に交互に相補的な塩基配列が連結した核酸の合成方法が提供される。本発明に基づくオリゴヌクレオチドをプライマーとして合成される相補鎖は、常にその 3' 末端が自身を鋳型とする新たな相補鎖合成の合成起点となる。このとき、新たなプライマーのアニールをもたらすループの形成を伴い、この部分からの相補鎖合成によって先に合成された自身を鋳型とする相補鎖合成反応の生成物は再び置換され塩基対結合が可能な状態となる。このようにして得ることができる自身を鋳型として合成された核酸は、たとえば SDA のような公知の核酸合成方法との組み合わせによって、それらの核酸合成効率の向上

に貢献する。

【0069】

更に本発明の望ましい態様によれば、単に公知の核酸合成方法の効率向上を達成するのみならず、複雑な温度制御を必要としない、しかも高度な増幅効率を期待でき、更には高い特異性を達成できる新規な核酸の合成方法が提供される。すなわち、本発明に基づくオリゴヌクレオチドを鋳型鎖とその相補鎖に対して適用することによって、1本鎖上に相補的な塩基配列が交互に連結された核酸が連続して合成されるようになる。この反応は、原理的には合成に必要な出発材料が枯渇するまで続き、その間にループ部分から合成を開始した新たな核酸を生成し続ける。こうして、ループ部分からのプライムが長い1本鎖核酸（すなわち、複数組の相補的な塩基配列が連結したもの）の伸長のための3'-OHを供給する鎖置換を行う。一方、長い1本鎖の3'-OHは自身を鋳型とする相補鎖合成反応を行うことによって自身の伸長を達成すると同時に、ループから合成開始した新たな相補鎖の置換を行う。このような増幅反応工程が、高い特異性を維持しながら等温条件下で進行する。

【0070】

本発明におけるオリゴヌクレオチドは、2つの連続した領域が設計どおりに配置されているときにはじめて本発明による核酸合成反応のためのプライマーとして機能する。このことが、特異性の維持に大きく貢献する。たとえばPCRでは、2つのプライマーの意図した位置関係とは無関係に、非特異的なミスアニールにより、非特異的増幅反応が開始してしまうことと比べれば、本発明では高い特異性が期待できることは容易に説明できる。

【0071】

本発明の特徴は、このような反応がごく単純な試薬構成で容易に達成できることにある。たとえば本発明によるオリゴヌクレオチドは、特殊な構造を持つとは言えそれは塩基配列の選択の問題であって、物質としては単なるオリゴヌクレオチドである。また、望ましい態様においては、鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒するDNAポリメラーゼのみで反応を進めることができる。あるいは、SDA等の公知の核酸合成反応に適用するとしても、本発明との組み合わせによって新たな酵素

が必要となるようなことはなく、単に本発明に基づくオリゴヌクレオチドを組み合わせるだけで各種反応系への適応が可能である。したがて、本発明による核酸合成方法は、コストの点においても有利といえる。

以上述べたように、本発明の核酸の合成方法とそのためのオリゴヌクレオチドは、操作性（温度制御不要）、合成効率の向上、経済性、そして高い特異性という、複数の困難な課題を同時に解決する新たな原理を提供する。

【0072】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Eiken Chemical Co.,Ltd.

<120> Method for Synthesizing The Nucleic Acid.

<130> E2-001

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 1

cgactctaga ggatccccgg gtactttttg ttgtgtggaa ttgtgagcgg at 52

<210> 2

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 2

acaacgtcgt gactgggaaa accctttttg tgcgggcctc ttcgctatta c 51

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 3

actttatgct tccggctcgt a 21

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 4

gttgggaagg gcgatcg

17

<210> 5

<211> 600

<212> DNA

<213> Bacteriophage M13mpl8

<400> 5

gcgccaata cgcaaaccgc ctctcccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 60
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaat tgagttagct 120
cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gtcgtatgt tgtgtggaat 180
tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240
cggtaaccgg ggatcctcta gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggca ctggccgtcg 300
ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac 360
atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac 420
agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgct ttgcctggtt tccggcacca gaagcgggtgc 480
cggaagctg gctggagtgc gatcttctg aggccgatac ggtcgtcgtc ccctcaaact 540
ggcagatgca cggttacgat gcgcccattt acaccaacgt aacctatccc attacgggtca 600

<210> 6

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 6

ctcttccaaa agtaaggcag gaaatgtgaa accagatcgt aatttggaag acccagcatc 60
cag 63

<210> 7

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 7

gtggattcgc actcctcccg ctgatcggga cctgcctcgt cgt 43

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 8

gccacctggg tgggaa

16

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 9

ggcgagggag ttcttcttct ag

22

<210> 10

<211> 430

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 10

ctccttgaca ccgcctctgc tctgtatcgg gaggccttag agtctccgga acattgttca 60
cctcaccata cagcactcag gcaagctatt ctgtgttggg gtgagttaat gaatctggcc 120

acctgggtgg gaagtaattt ggaagaccca gcatccaggg aattagtagt cagctatgtc 180
aatgttaata tgggcctaaa aatcagacaa ctattgtggt ttcacatttc ctgccttact 240
tttgggaagag aaactgtttt ggagtatttg gtatcttttg gagtgtggat tcgcactcct 300
cccgcctaca gaccacaaaa tgcccctatc ttatcaacac ttccggaaac tactgttggt 360
agacgacgag gcaggtcccc tagaagaaga actccctcgc ctgcagacg aaggtctcaa 420
tcgccgcgtc 430

<210> 11

<211> 293

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized sequence

<400> 11

acaacgtcgt gactgggaaa accctttttg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg 60
cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttaggtaac gccagggttt tcccagtcac 120
gacgttgtaa aacgacggcc agtgccaagc ttgcatgcct gcaggtcgac tctagaggat 180
ccccgggtac cgagctcgaa ttcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt 240
tatccgctca caattccaca caacaaaaag taccgggga tcctctagag tcg 293

<210> 12

<211> 293

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized sequence

<400> 12

cgactctaga ggatccccgg gtactttttg ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt 60
cacacaggaa acagctatga ccatgattac gaattcgagc tcggtaccg gggatcctct 120
agagtcgacc tgcaggcatg caagcttggc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg 180
ggaaaaccct ggcgttaccc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg 240
gcgtaatagc gaagaggccc gcacaaaaag ggttttccca gtcacgacgt tgt 293

<210> 13

<211> 459

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized sequence

<400> 13

acaacgtcgt gactgggaaa accctttttg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg 60
cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac 120
gacgttgtaa aacgacggcc agtgccaagc ttgcatgcct gcaggtcgac tctagaggat 180
ccccgggtac cgagctcgaa ttcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt 240
tatccgctca caattccaca caacaaaaag taccggggga tcctctagag tcgacctgca 300
ggcatgcaag cttggcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg 360
ttaccaact taatgcctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag 420
aggcccgcac aaaaagggtt ttccagtcga cgacgttgt 459

<210> 14

<211> 458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized sequence

<400> 14

```
cgactctaga ggatccccgg gtactttttg ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt 60
cacacaggaa acagctatga ccatgattac gaattcgagc tcggtaccgg gggatcctct 120
agagtcgacc tgcaggcatg caagcttggc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg 180
ggaaaaccct ggCgttacc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg 240
gcgtaatagc gaagaggccc gcacaaaaag ggttttccca gtcacgacgt tgtaaaacga 300
cggccagtgc caagcttgca tgcctgcagg tcgactctag aggatccccg ggtaccgagc 360
tcgaattcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt 420
ccacacaaca aaaagtaccc ggggatcctc tagagtcg                                458
```

<210> 15

<211> 790

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized sequence

<400> 15

acaacgtcgt gactgggaaa accctttttg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg 60
 cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac 120
 gacgtttgtaa aacgacggcc agtgccaagc ttgcatgcct gcaggtcgac tctagaggat 180
 ccccggttac cgagctcgaa ttcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt 240
 tatccgctca caattccaca caacaaaaag taccggggga tcctctagag tcgacctgca 300
 ggcatgcaag ctgggcactg gccgtcggtt tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg 360
 ttaccaact taatcgctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag 420
 agggccgcac aaaaagggtt ttcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc cagtgcgaag 480
 ctgcatgcc tgcaggtcga ctctagagga tccccgggta cttttgttg tgtggaattg 540
 tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgaa ttcgagctcg 600
 gtaccgggg atcctctaga gtcgacctgc aggcatgcaa gcttggcact ggccgtcggt 660
 ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttaccaaac ttaatcgctt tgcagcacat 720
 cccctttcgc ccagctggcg taatagcgaa gagggccgca caaaaagggt tttcccagtc 780
 acgacgttgt 790

<210> 16

<211> 789

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 synthesized sequence

<400> 16

cgactctaga ggatccccgg gtactttttg ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt 60
 cacacaggaa acagctatga ccatgattac gaattcgagc tcggtaccgg gggatcctct 120
 agagtcgacc tgcaggcatg caagcttggc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg 180
 ggaaaaccct ggcgttaccc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg 240

gcgtaatagc gaagaggccc gcacaaaaag gggtttccca gtcacgacgt tgtaaaacga 300
 cggccagtgc caagcttgca tgcctgcagg tcgactctag aggatccccg ggtaccgagc 360
 tccaattcgt aatcatgggc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt 420
 ccacacaaca aaaagtaccc ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcat gcaagcttgg 480
 cactggccgt cgttttacaa cgtcgtgact gggaaaaccc ttttgtgcg ggcctcttcg 540
 ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca 600
 gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagt ccaagcttgc atgcctgcag 660
 gtcgactcta gaggatcccc gggtagcgag ctggaattcg taatcatggt catagctgtt 720
 tcctgtgtga aattgttacc cgtcacaat tccacacaac aaaaagtacc cggggatcct 780
 ctagagtcg 789

<210> 17

<211> 310

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 synthesized sequence

<400> 17

gtggattcgc actcctcccc ctgacggga cctgcctcgt cgtctaaca cagtagtttc 60
 cggaagtgtt gataagatag gggcatttgg tggctgttaa gcgggaggag tgcgaatcca 120
 cactccaaaa gataccaaat actccaaaac agtttctctt ccaaaagtaa ggcaggaaat 180
 gtgaaaccac aatagttgtc tgatttttag gcccatatta acattgacat agctgactac 240
 taattccctg gatgctgggt ctccaaatt acgatctggt ttcacatttc ctgccttact 300
 ttggaagag 310

<210> 18

<211> 465

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized sequence

<400> 18

```
gtggattcgc actcctcccg ctgatacgga cctgcctcgt cgtctaaca cagtagtttc 60
cggaagtgtt gataagatag gggcatttgg tggctgttaa gcgggaggag tgcgaatcca 120
cactccaaaa gataccaaat actccaaaac agtttctctt ccaaaagtaa ggcaggaaat 180
gtgaaaccac aatagttgtc tgatttttag gcccatatta acattgacat agctgactac 240
taattccctg gatgctgggt cttccaaatt acgatctggt ttcacatttc ctgccttact 300
tttgaagag aaactgtttt ggagtatttg gtatcttttg gagtgtggat tcgcactcct 360
cccgttaca gaccacaaa tgcccctatc ttatcaacac ttccggaaac tactgttgtt 420
agacgacgag gcaggtcccg atcagcgga ggagtgcgaa tccac 465
```

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の望ましい態様の反応原理の一部(1)-(4)を示す模式図。

【図2】本発明の望ましい態様の反応原理の一部(5)-(7)を示す模式図。

【図3】本発明の望ましい態様の反応原理の一部(8)-(10)を示す模式図。

【図4】本発明による1本鎖核酸が形成するループの構造を示す模式図。

【図5】本発明による基礎的な態様の一部(A)-(B)を示す模式図。

【図6】本発明による基礎的な態様の一部(C)-(D)を示す模式図。

【図7】M13mp18の標的塩基配列における、オリゴヌクレオチドを構成する各塩基配列の位置関係を示す図。

【図8】M13mp18を鋳型として本発明による1本鎖核酸の合成方法によって

得られた生成物のアガロース電気泳動の結果を示す写真。

レーン 1 : XIV size marker

レーン 2 : 1 fmol M13mp18 dsDNA

レーン 3 : targetなし

【図 9】 実施例 1 によって得られた本発明による核酸合成反応の生成物を制限酵素で消化しアガロース電気泳動した結果を示す写真。

レーン 1 : SUPERLADDER-LOW (100bp ladder)

レーン 2 : 精製物のBamHI消化物

レーン 3 : 精製物のPvuII消化物

レーン 4 : 精製物のHindIII消化物

【図 10】 HBV由来の標的塩基配列における、オリゴヌクレオチドを構成する各塩基配列の位置関係を示す図。

【図 11】 M13mp18に組みこまれたHBV-M13mp18を鋳型として本発明による 1 本鎖核酸の合成方法によって得られた生成物のアガロース電気泳動の結果を示す写真。

レーン 1 : XIV size marker

レーン 2 : 1 fmol HBV-M13mp18 dsDNA

レーン 3 : targetなし

【図 12】 本発明による 1 本鎖核酸の合成方法によって得られた生成物のアルカリ変性ゲル電気泳動の結果を示す写真。

レーン 1 : ラムダファージのHindIII消化断片

レーン 2 : 実施例 1 の反応生成物

レーン 3 : 実施例 3 の反応生成物

【図 13】 ターゲットであるM13mp18の濃度を変えてときに、本発明による 1 本鎖核酸の合成方法によって得られた生成物のアガロース電気泳動の結果を示す写真。上は反応時間 1 時間、下は反応時間 3 時間の結果である。

レーン 1 : M13mp18 dsDNA 1×10^{-15} mol/tube

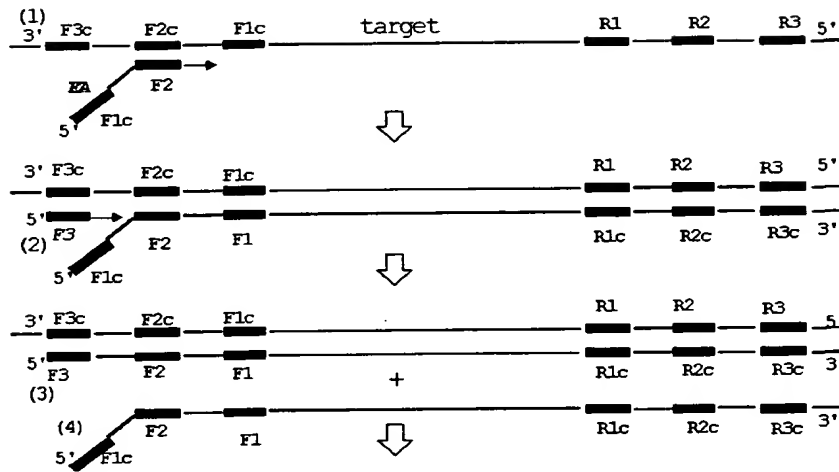
レーン 2 : M13mp18 dsDNA 1×10^{-16} mol/tube

レーン 3 : M13mp18 dsDNA 1×10^{-17} mol/tube

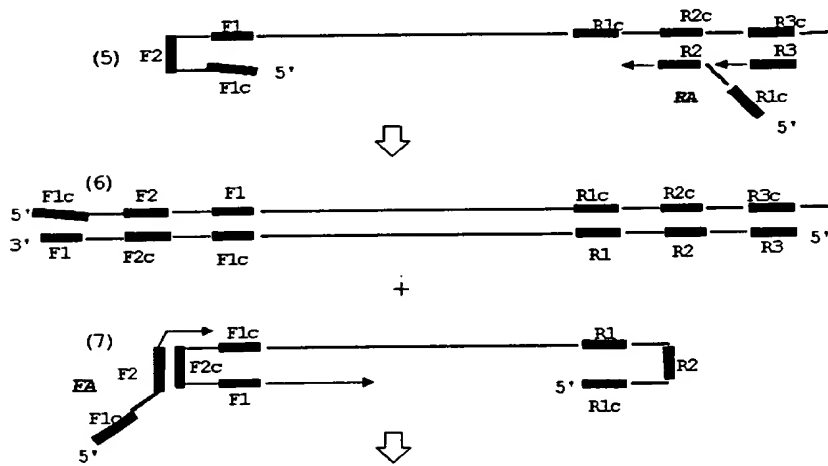
レーン 4 : M13mp18 dsDNA 1×10^{-18} mol/tube
レーン 5 : M13mp18 dsDNA 1×10^{-19} mol/tube
レーン 6 : M13mp18 dsDNA 1×10^{-20} mol/tube
レーン 7 : M13mp18 dsDNA 1×10^{-21} mol/tube
レーン 8 : M13mp18 dsDNA 1×10^{-22} mol/tube
レーン 9 : target なし
レーン 1 0 : XIV size marker

【書類名】 図面

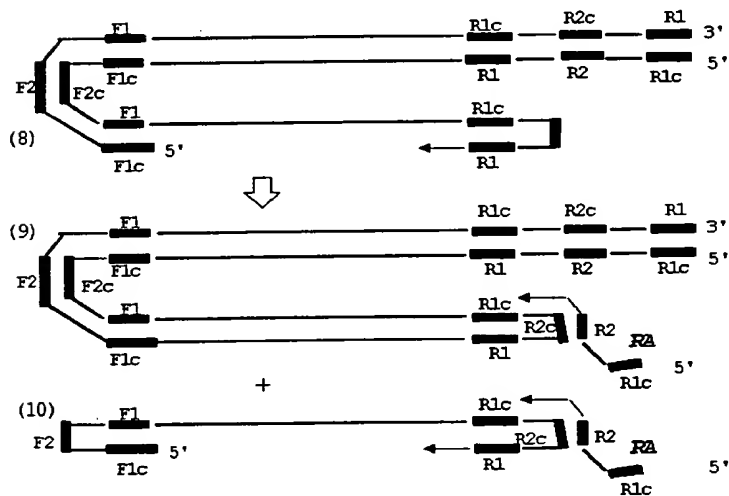
【図 1】



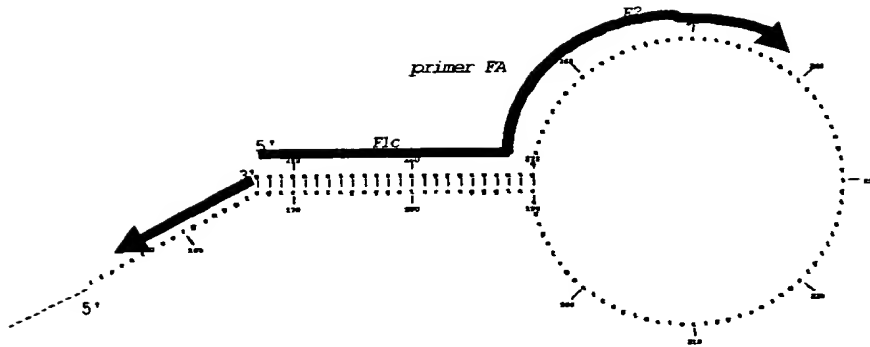
【図 2】



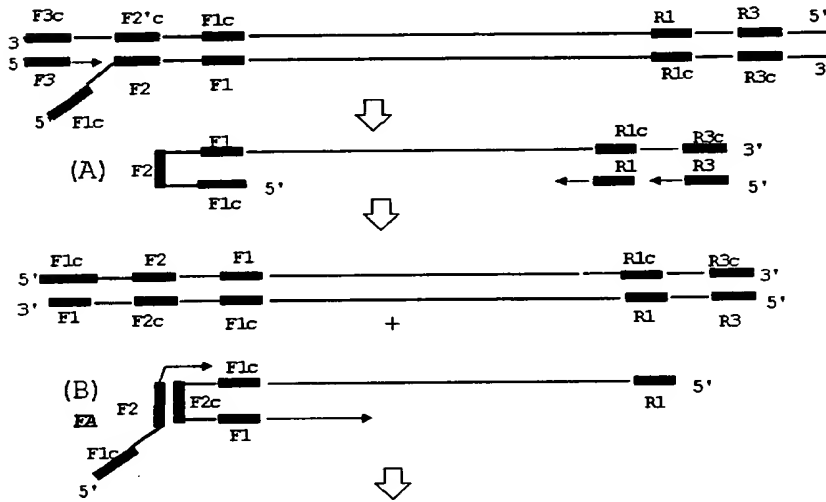
【図 3】



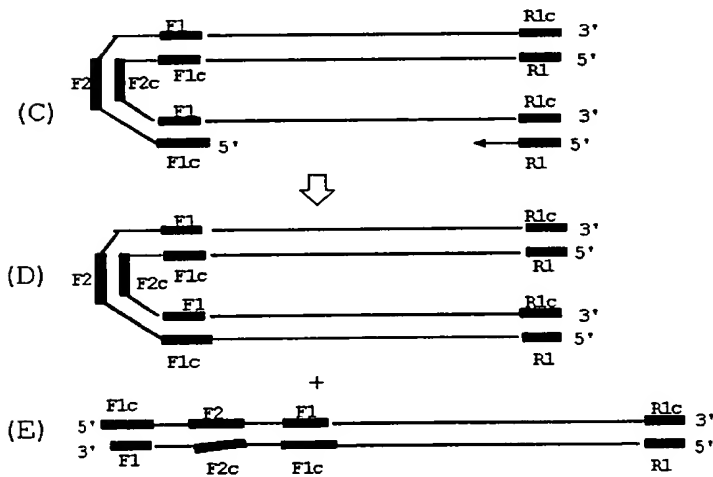
【図 4】



【図 5】



【図 6】

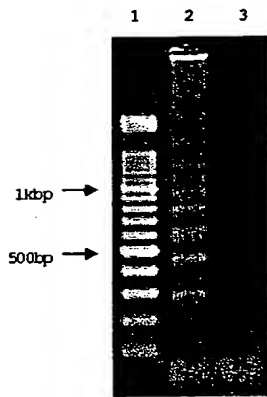


【図 7】

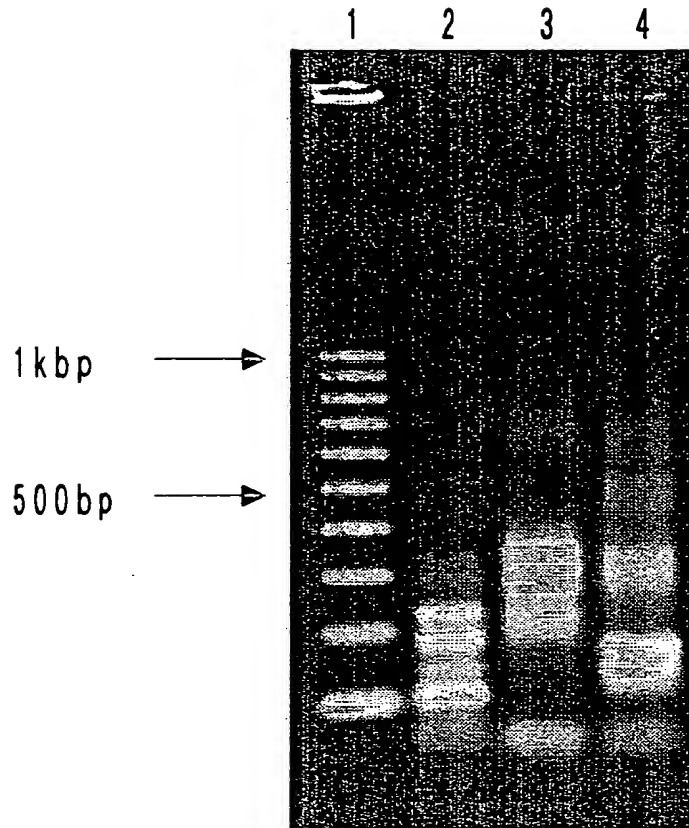
```

6001 GGGGCAATA CGCAACGCG CTCGCGCGC GCGTGGGCG ATTCATTAA GCAGCTGGCA
6061 CGACAGGTTT CCGACTGGA AAGCGGCGC TGAGCGCAC GCAATTAAAT TGAGTTAGCT
6121 CACTCATTAG GCACCGCAG CTTTACACTT TATGCTTCCG GCTCGTATGT TGTGTGGAAT
        M13F3      M13F2
        <----->
6181 TGTGAGGGA TAACAATTTC ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG AATTGAGCT
        M13F1c
        <----->
6241 CGGTACCGG GGATCCTCTA GAGTGGACT GCAGGCATGC AAGCTTGGCA CTGGCGGTGG
        M13R1c
        <----->
6301 TTTTACAAAG TGTGACTGG GAAACCGCTG GCGTTACCA ACTTAATGCG CTGCGAGCAC
        M13R2      M13R3
        <----->
6361 ATGCGCGTTT CGCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCGCG CACCGATGCG CCTTCCGAC
6421 AGTTGCGCAG CCTGAATGCG GAATGGGCGT TTGCGTGGTT TCGGCGACA GAAGCGGTGC
6481 CGGAAGCTG GCTGGAGTGC GATCTTCTG AGGCGGATAC GGTGGTGGTC CCTCAAACT
6541 GCGAGATGCA CGGTACGAT GCGCGCATCT ACACCAAGCT AACCTATGCC ATTAAGGTCA
    
```

【図 8】



【図 9】

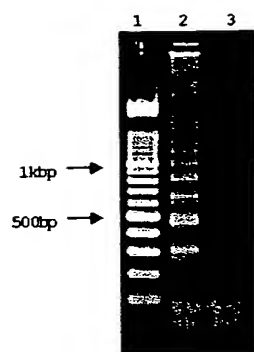


【図 10】

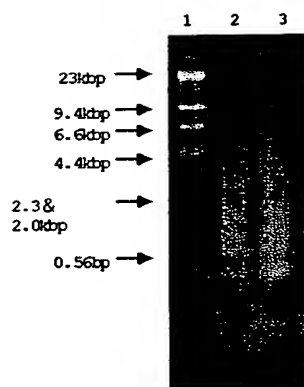
```

1 CTCTTGACA CGGCTCTGC TCTGTATGG GAGGCTTAG AGTCTCGGA ACATTGTCA
61 CCTCACCATA CAGCACTCAG GCAGCTATT CTGTGTTGGG GTGAGTTAAT GAATCTGGC
   HBF3          HB65F2
121 ACCTGGGTGG GAGTAAATTT GGAGACCCA GCATCCAGGG AATTAGTAGT CAGCTATGTC
   HB65F1c
181 AATGTTAATA TGGGCTAAA AATCAGACAA CTATTGTGGT TTACATTTTC CTGCTTACT
   HB65R1c
241 TTGGAGAGAG AACTGTTTT GGAGTATTIG GTATCTTTTG GAGTGTGGAT TOGCACTOCT
   HB65R2          HBR3
301 CCGCTTACA GACCAACAAA TGCCCTATC TTATCAACAC TTCGGAAAC TACTGTGTGT
361 AGAGAGAGAG GCAGGTCCC TAGAAGAGA ACTCCCTGC CTGCAGAGG AAGGTCTCAA
421 TGGCCGGTC
    
```

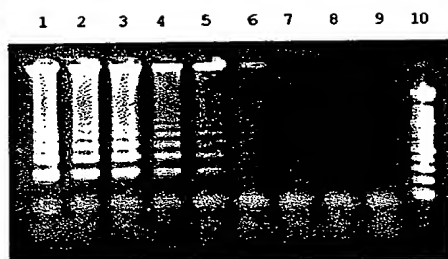
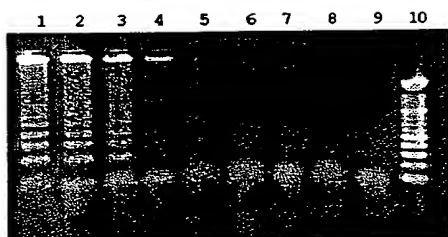
【図 11】



【図 1 2】



【図 1 3】



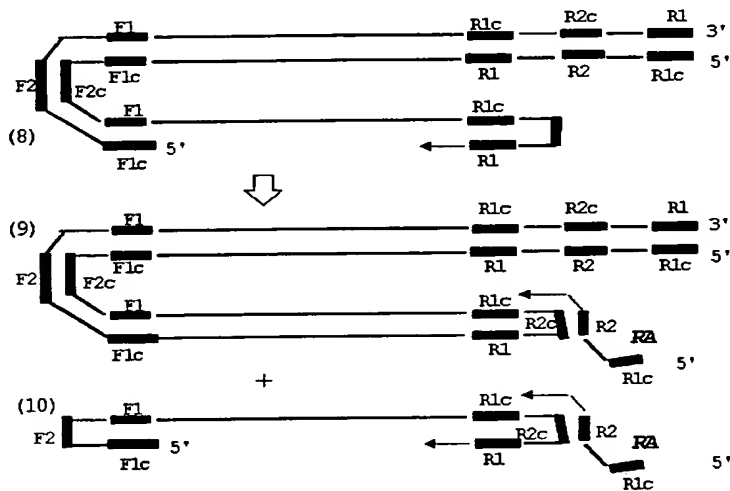
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、複雑な温度制御が不要な核酸合成方法の提供を課題とする。

【解決手段】 本発明は、新規な構造のオリゴヌクレオチドと、それをプライマーとする核酸の合成方法である。このオリゴヌクレオチドは、プライマーの5'側に、このプライマーを合成起点として合成される領域と実質的に同じ塩基配列を備える。本発明は、単純な試薬構成で等温反応に基づく核酸の合成を実現する。

【選択図】 図3



【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000120456

【住所又は居所】

東京都文京区本郷1丁目33番8号

【氏名又は名称】

栄研化学株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階

清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】

100108774

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階

清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

橋本 一憲

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000120456]

1. 変更年月日

1990年 8月 9日

[変更理由]

新規登録

住 所

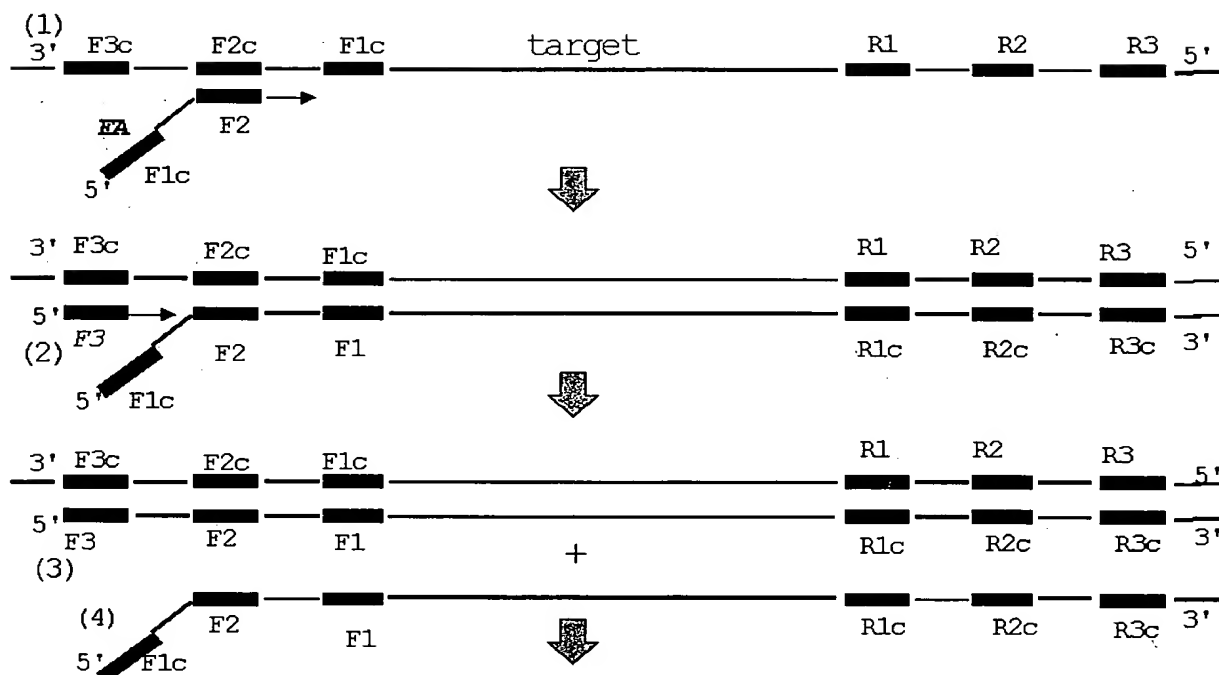
東京都文京区本郷1丁目33番8号

氏 名

栄研化学株式会社

Fig. 1

6410278



100052120

2005

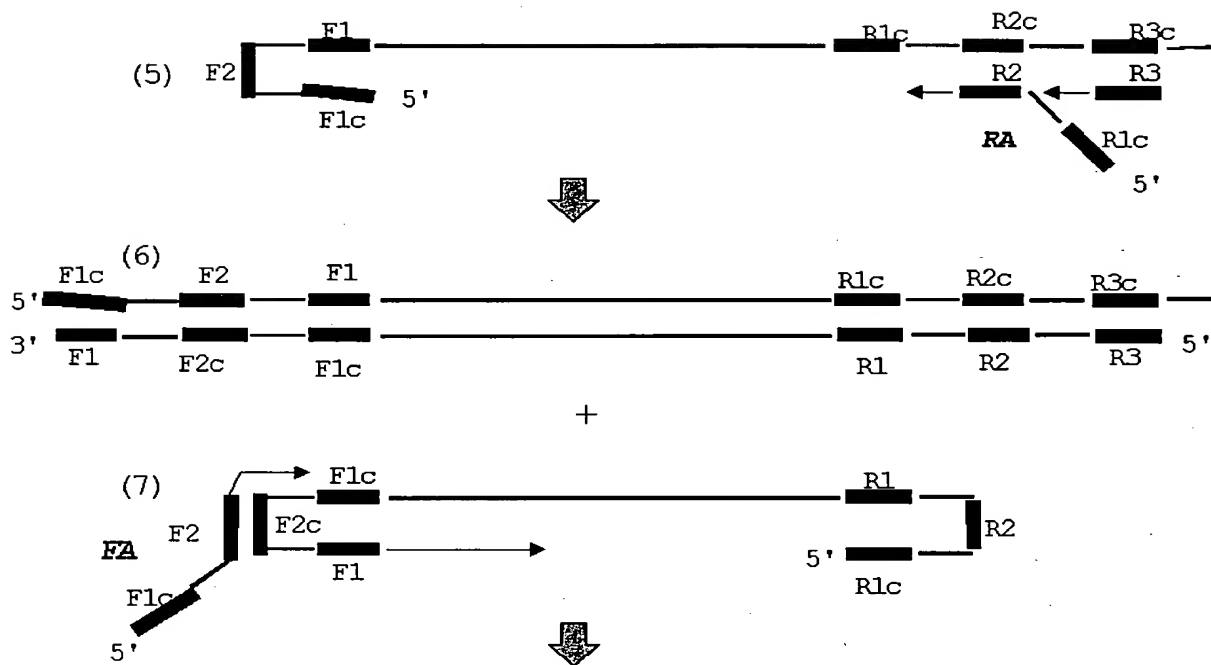
526 PCT/PTC 21 APR 2000

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	1 of 18

2 / 18

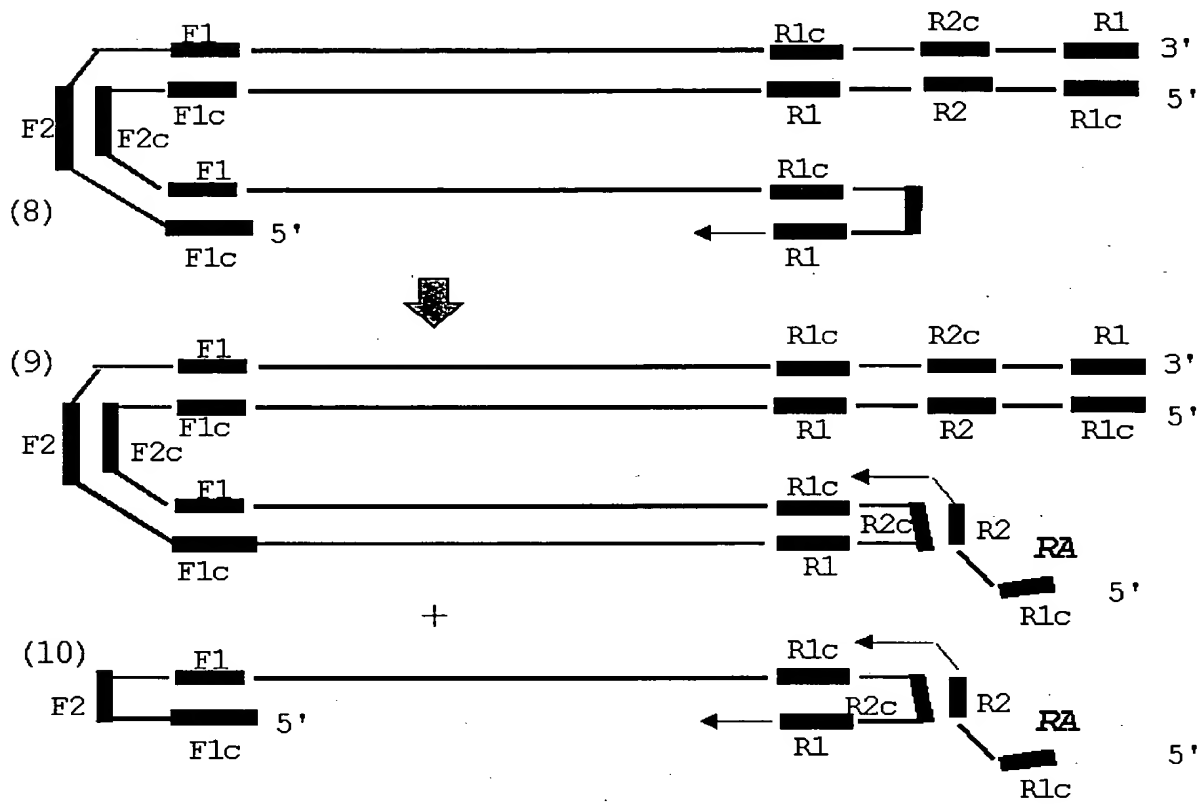
Fig. 2



Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	2 of 18

Fig. 3



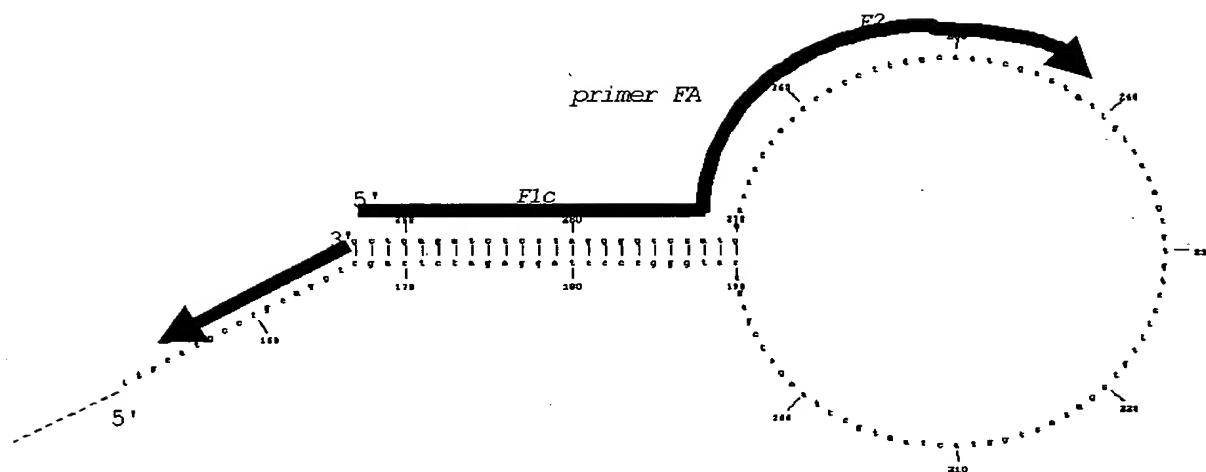
130008 2180

526 Reel PCT/PTO 21 APR 2000

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	3 of 18

Fig. 4



1400027190

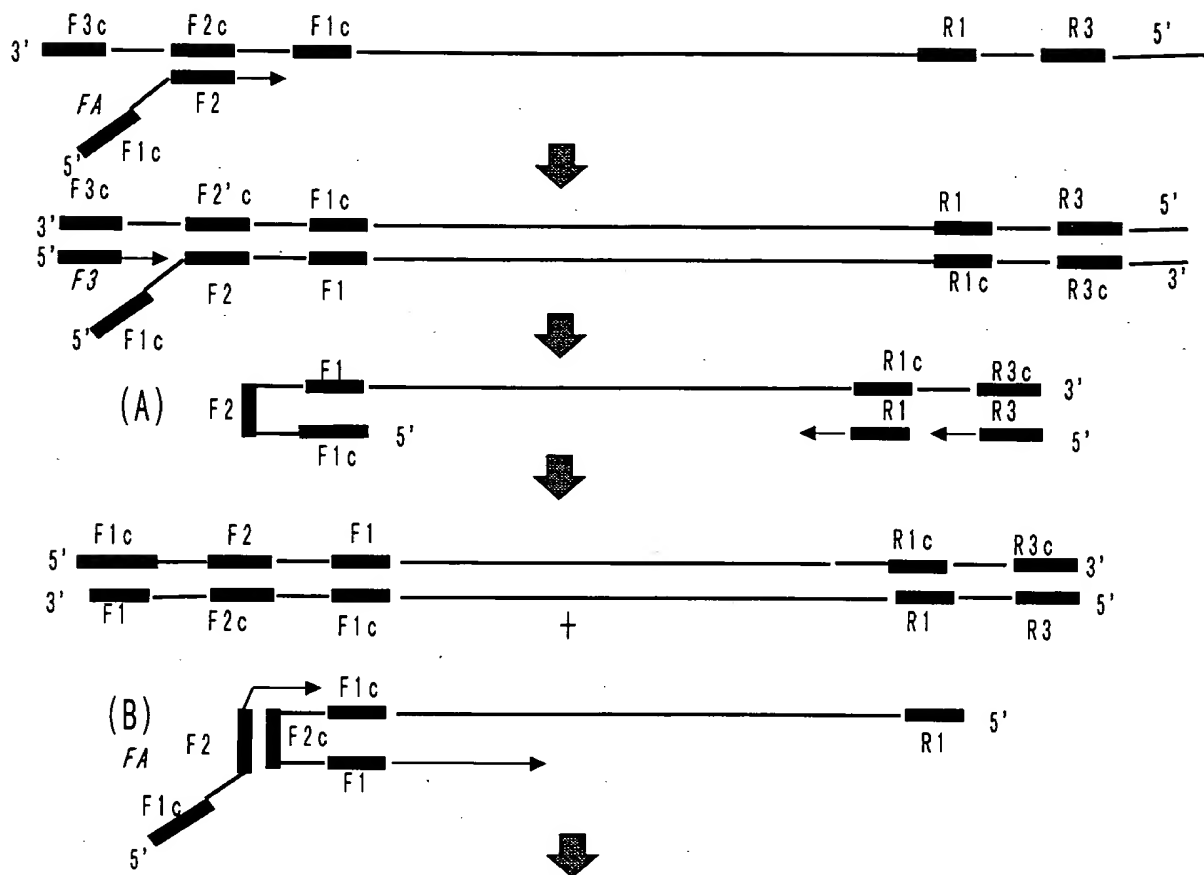
526 Rec'd FCT/PTC 21 APR 2000

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	4 of 18

5/18

Fig. 5



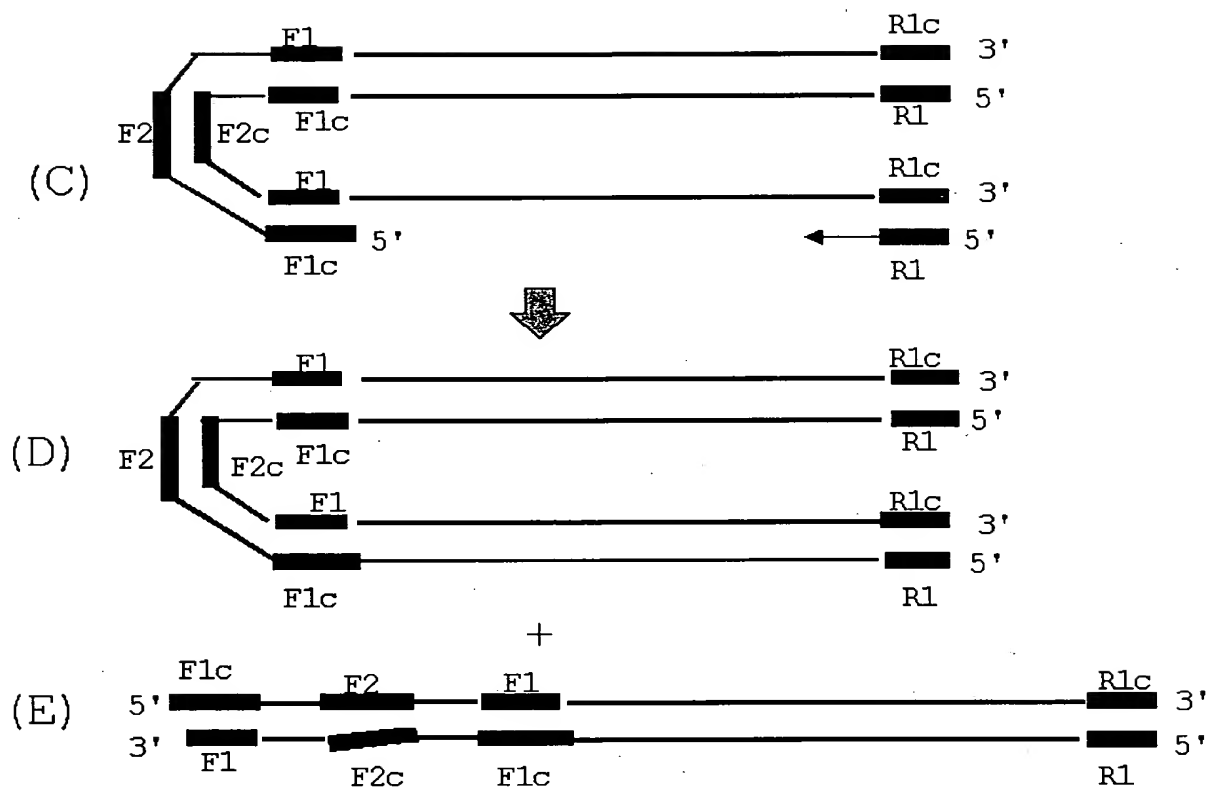
180052180

526 Rec'd PCT/PTC 21 APR 2000

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	5 of 18

Fig. 6



1800022120

526 PCT/PTO 21 APR 2000

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	6 of 18

7/18

Fig. 7

6001 GCGCCCAATA CGCAAACCGC CTCTCCOOCG GCGTTGGOCG ATTCATTAAT GCAGCTGGCA

6061 CGACAGGTTT CCGACTGGA AAGCGGGCAG TGAGCGCAAC GCAATTAATG TGAGTTAGCT

6121 CACTCATTAG GCACCCAGG CTTTACACTT TATGCTTCCG GCTCGTATGT TGTGTGGAAT

6181 TGTGAGOGGA TAACAATTTT ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG AATTCGAGCT

6241 OGGTACOCGG GGATCCTCTA GAGTCGACCT GCAGGCATGC AAGCTTGCCA CTGGCOGTGC

6301 TTTTACAACG TCGTGACTGG GAAAACCTG GCGTTAOCOA ACTTAATOGC CTTGCAGCAC

6361 ATCCCCCTTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGOCOC CACCGATOCG CCTTCCCAAC

6421 AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGGCGCT TTGOCTGGTT TOCGGCACCA GAAGCGGTGC

6481 OGGAAAGCTG GCTGGAGTGC GATCTTCCTG AGGOCGATAC GGTCGTCGTC CCTCAAAC

6541 GGCAGATGCA CGGTTACGAT GCGCCCATCT ACAOCAAOGT AACCTATOCCT ATTACGGTCA

Diagram illustrating the sequence alignment of a DNA fragment (Fig. 7) with various primers (M13F3, M13F2, M13F1c, M13R1c, M13R2, M13R3) and their corresponding sequences. The sequences are shown in blocks of 60 nucleotides, with primers indicated by arrows above or below the sequence.

160082190

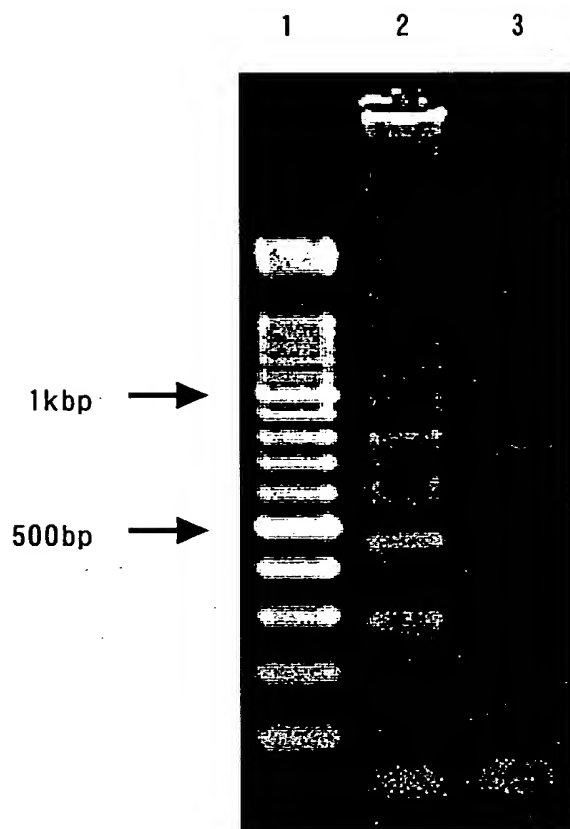
526 R PCT/PT3 21 APR 2000

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	7 of 18

8/18

Fig. 8



1200032180

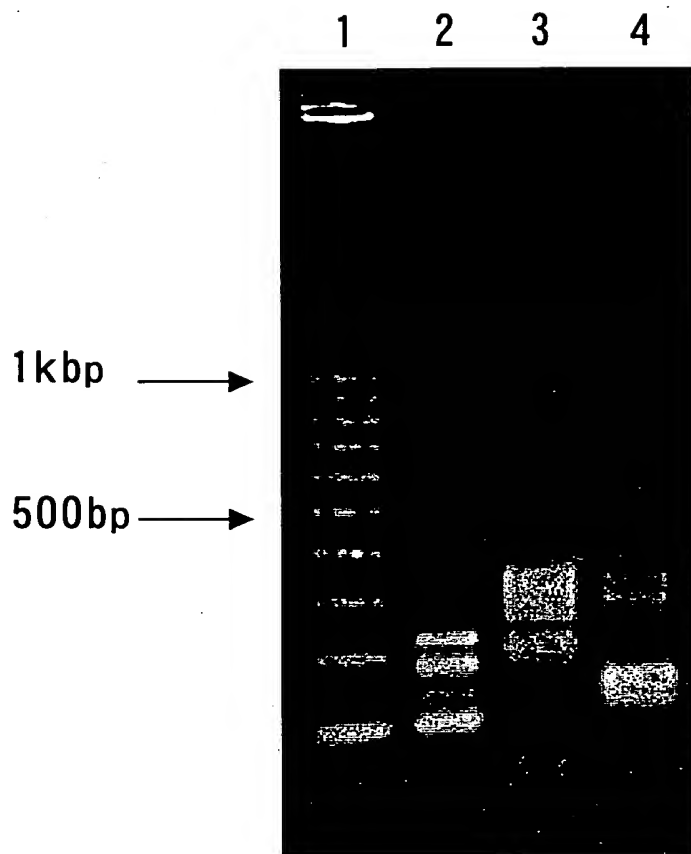
526 Rec'd PCT/PTO 21 APR 2000

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	8 of 18

9/18

Fig. 9



100052190

526 R PCT/PTO 21 APR 2000

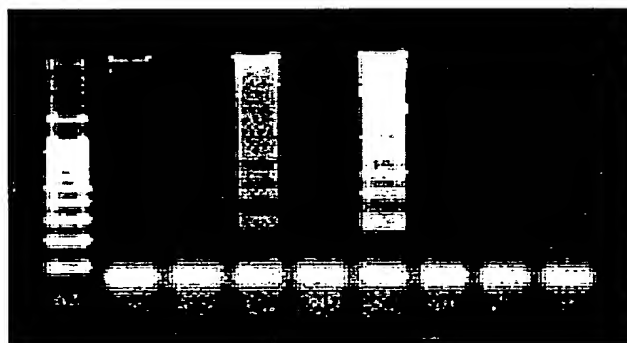
Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	9 of 18

10/18

Fig. 10

0 0.5 1 2M
-21 N -21 N -21 N -21 N



000589A 12 0701098-001386

1300022190

526 Rec'd PCT/PTO 21 APR 2000

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	10 of 18

11/18

Fig. 11

1 CTCCTTGACA CCGCCTCTGC TCTGTATCGG GAGGOC'TTAG AGTCTCCGGA ACATTGTTCA
 61 OCTCACCATA CAGCACTCAG GCAAGCTATT CTGTGTTGGG GTGAGTTAAT GAATCTGGOC
 HBF3 HB65F2
 121 ACC'TGGGTGG GAAGTAATTT GGAAGACCCA GCATCCAGGG AATTAGTAGT CAGCTATGTC
 HB65F1c
 181 AATGTTAATA TGGGOC'TAAA AATCAGACAA CTATTGTGGT TTCACATTTT CTGCCTTACT
 HB65R1c
 241 TTTGGAAGAG AAAC'TGTTTT GGAGTATTTG GTATCTTTTG GAGTGIGGAT TCGCACTCCT
 301 CCCGCTTACA GACCACCAA TGCCCCTATC TTATCAACAC TTCCGGAAAC TACTGT'TGTT
 HB65R2 HBR3
 361 AGACGACGAG GCAGGTCCCC TAGAAGAAGA ACTOCC'TCGC CTCGCAGACG AAGGTCTCAA
 421 TCGCCGCGTC

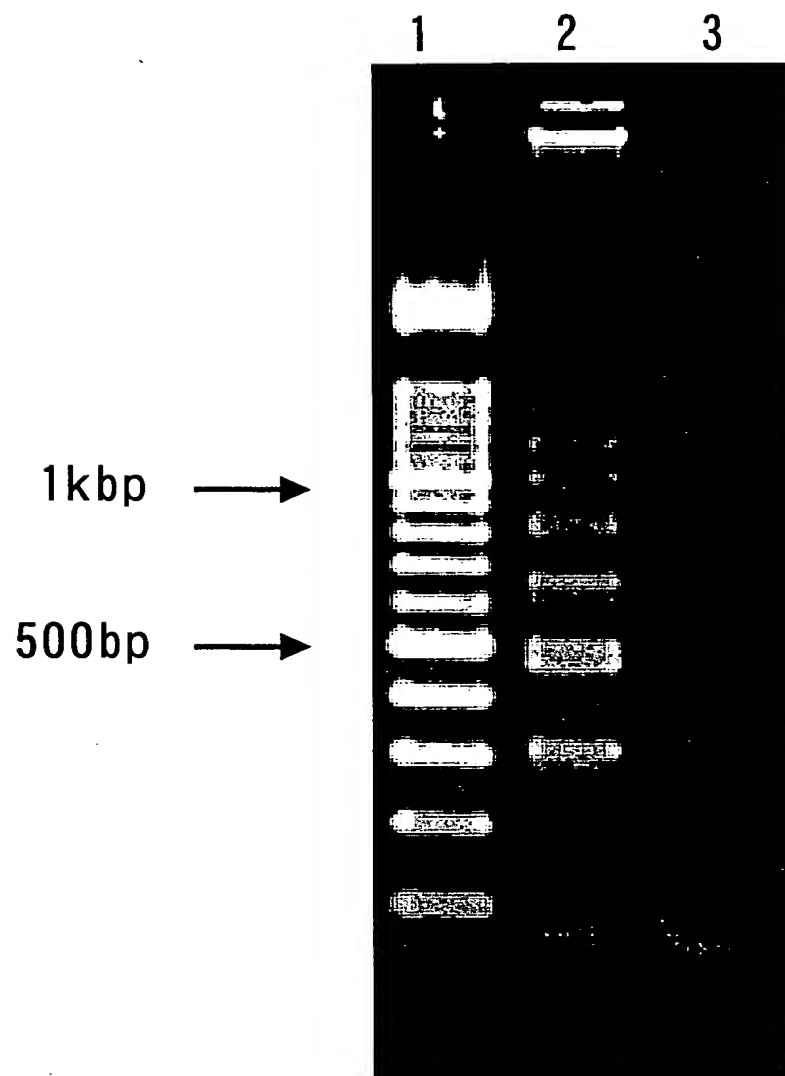
180082180

526 R PCT/PTC 21 APR 2000

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	11 of 18

Fig. 12



1200052180

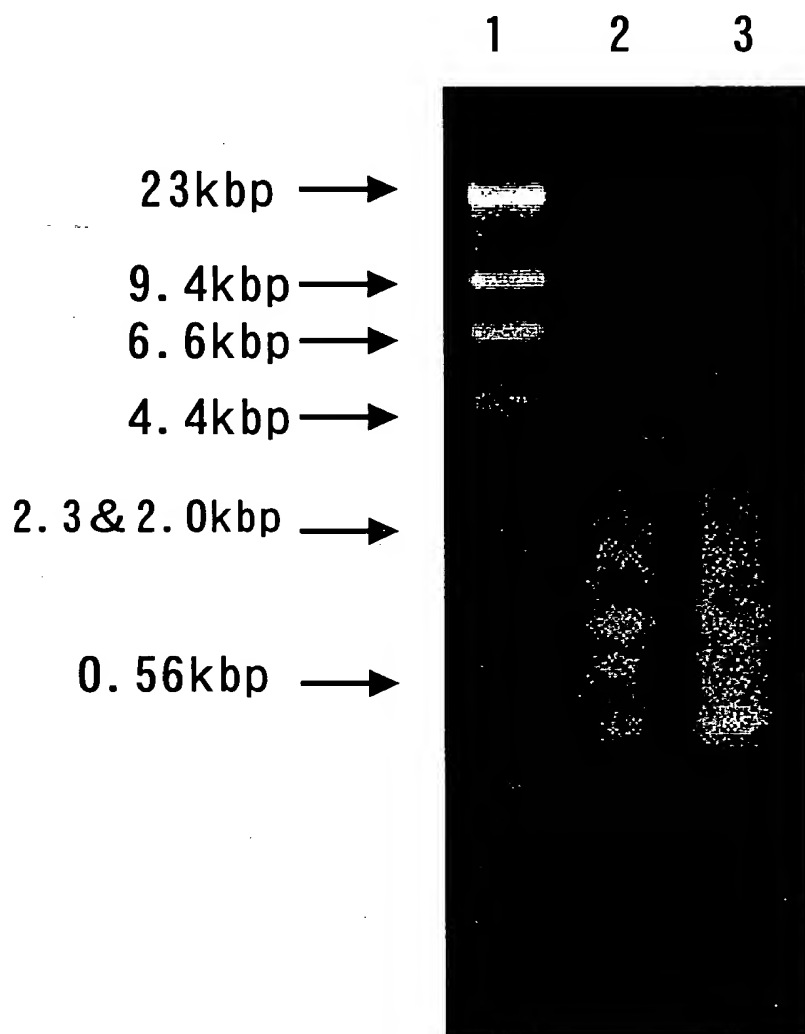
526 Rec'd PCT/PTO 21 APR 2009

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	12 of 18

13/18

Fig. 13



120003 2180

526 Rec'd PCT/PTC 21 APR 2003

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
P	
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
age:	13 of 18

[illegible]

100052190

526 PCT/PTO 21 APR 2000

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	14 of 18

15/18

Fig. 15

6001 GCGCCCAATA CGCAAACCGC CTCTCCCCGC GCGTTGGCCG ATTCATTAAT GCAGCTGGCA
6061 CGACAGGTTT CCCGACTGGA AAGCGGGCAG TGAGCGCAAC GCAATTAATG TGAGTTAGCT
M13F3 M13F2 d4
6121 CACTCATTAG GCACCCAGG CTTTACACTT TATGCTTCCG GCTCGTATGT TGTGTGGAAT
M13F1c d4
6181 TGTGAGCGGA TAACAATTTT ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG AATTCGAGCT
6241 CGGTACCCGG GGATCCTCTA GAGTCGACCT GCAGGCATGC AAGCTTGGCA CTGGCCGTCG
M13R1c d4 A
6301 TTTTACAACG TCGTGACTGG GAAAACCTG GCGTTACCA ACTTAATCGC CTTGCAGCAC
M13R2 d4 M13R3
6361 ATCCCCCTTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCCG CACCGATCGC CCTTCCCAAC
6421 AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGGCGCT TTGCCTGGTT TCCGGCACCA GAAGCGGTGC
6481 CGGAAAGCTG GCTGGAGTGC GATCTTCCTG AGGCCGATAC GGTCGTCGTC CCCTCAAAC
6541 GGCAGATGCA CGGTTACGAT GCGCCCATCT ACACCAACGT AACCTATCCC ATTACGGTCA

000599A 13 0771231-1091

160082190

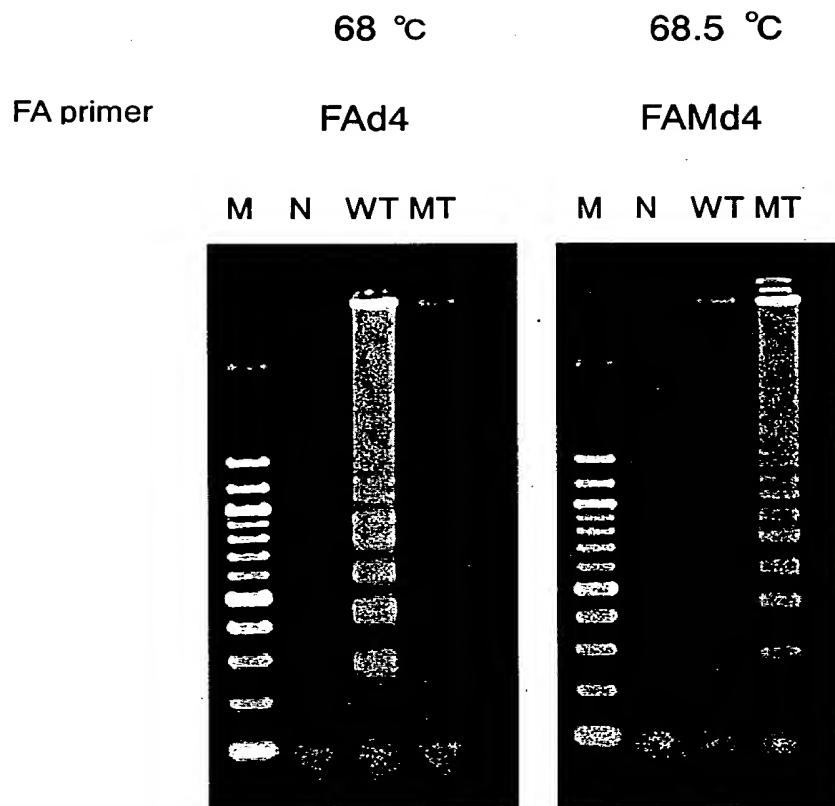
526 Rec'd PCT/PTO 21 APR 2000

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	15 of 18

16/18

Fig. 16



000000 000000 000000 000000

1200052190

526 Rec'd PCT/PTO 21 APR 2000

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	16 of 18

Fig. 17

1 ATTCCGCCGG AGAGCTGTGT CACCATGTGG GTCCCGGTTG TCTTCCTCAC CCTGTCCGTG

61 ACGTGGATTG GTGCTGCACC CCTCATCCTG TCTCGGATTG TGGGAGGCTG GGAGTGCGAG

121 AAGCATTCCC AACCCCTGGCA GGTGCTTGTG GCCTCTCGTG GCAGGGCAGT CTGCGGCGGT

181 GTTCTGGTGC ACCCCCAGTG GGTCCCTACA GCTGCCCCACT GCATCAGGAA CAAAAGCGTG

241 ATCTTGCTGG GTCGGCACAG CCTGTTTCAT CCTGAAGACA CAGGCCAGGT ATTCAGGTC

301 AGCCACAGCT TCCCACACCC GCTCTACGAT ATGAGCCTCC TGAAGAATCG ATTCCTCAGG

361 CCAGGTGATG ACTCCAGCCA CGACCTCATG CTGCTCCGCC TGTCAGAGCC TGCCGAGCTC

421 ACGGATGCTG TGAAGGTCAT GGACCTGCCC ACCCAGGAGC CAGCACTGGG GACCACCTGC

481 TACGCCTCAG GCTGGGGCAG CATTGAACCA GAGGAGT

021000000000

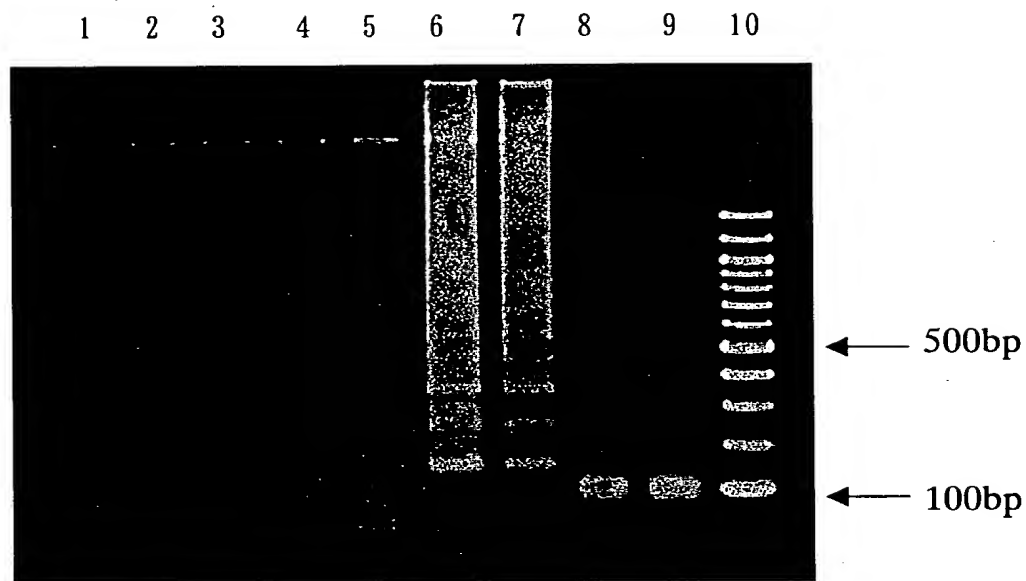
526 Rec'd PCT/PTC 21 APR 2000

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	17 of 18

18/18

Fig. 18



1200E21P0

526 PCT/PTO 21 APR 2000

Nixon Peabody LLP
Clinton Square, P.O. Box 1051
Rochester, New York 14603
Telephone: (716) 263-1304

Inventors:	Tsugunori Notomi and Tetsu Hase
Title:	METHOD OF SYNTHESIZING NUCLEIC ACID
Serial No:	To Be Assigned
Filing Date:	Herewith
Docket No:	201487/1020 (E2-001PCT-US)
Express Mail No:	EL434485922US
Page:	18 of 18